

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИНОГЕННОСТИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* LINK (1809)

Кузнецова Н. А., Федорович С.В., Астапчук И. Л., к.б.н.
тел. 8(918) 110-21-87, N9181102187n@yandex.ru
ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ

Ключевые слова: *Fusarium*, токсины, трихотеценкодирующие гены

В данной статье представлены данные оценки лабораторных штаммов *Fusarium* spp. как потенциальных продуцентов микотоксинов. Было показано, что два штамма содержат последовательность ДНК гена триходиенсиназы (*tri5*), два - ДНК гена триходиенсиназы (*tri7*) и один - ДНК гена триходиенсиназы (*tri13*). Наличие изученных генов может являться одним из факторов патогенеза на важнейших сельскохозяйственных культурах.

Введение. Грибы рода *Fusarium* являются одними из опаснейших патогенов, большая часть которых – космополиты, поражающие многие сельскохозяйственные культуры: зерновые, овощные, бобовые, плодовые и др. Данные микромицеты способны вызывать загнивание корневой системы, повреждение колоса и початков, трахеомикозы сосудистой системы, хлорозы и некрозы листовой пластины и стеблей, гниль плодов и др. [1-5]. При поражении грибами рода *Fusarium*, растение погибает чаще всего в первую половину вегетации, что приводит к 30 – 80 % и более потери урожая в зависимости от поражаемого объекта [1-2, 5]. Фитопатогены данного рода являются факультативными сапротрофами, способные образовывать анаморфную (бесполоую) и телеоморфную (половую) стадию, что позволяет им выживать и сохранять жизнеспособность на протяжении нескольких лет как в почве, так и на растительных остатках [1].

За последнее время все больше отмечается их распространение и вредоносность на сельскохозяйственных культурах. Главной

опасностью рассматриваемой группы фитопатогенов выступает их способность к продуцированию широкого спектра микотоксинов. Фитопатогенные грибы рода *Fusarium* продуцируют огромный спектр трихотеценовых микотоксинов группы А, а также Т-2 токсин, НТ-токсин, Т-2 триол, неосоланин (НЕО), моноацетоксисцирпенол, диацетоксисцирпенол (ДАС), дезоксиниваленол (ДОН) и т. д. [6-7].

На сегодняшний день существует множество методов молекулярно-генетической диагностики содержания фитопатогенов и их токсинов в растительном материале [7-10]. Для многих видов рода *Fusarium* характерна группа трихотеценовых микотоксинов, в то же время некоторые виды или штаммы не способны к биосинтезу этих соединений. Выявлено, что за биосинтез трихотеценовых микотоксинов ответственен кластер из 12 генов (tri3 – tri14) и 3 гена, расположенных отдельно (tri101, tri1, tri16), а также определены их функции [6, 8]. На основе последовательности нуклеотидов tri5, контролирующего первый этап синтеза трихотеценовых токсинов созданы праймеры Tox5–1/Tox5–2, кроме того, сравнительный анализ кластеров генов изолятов продуцирующих дезоксиниваленол (ДОН) и ниваленол (НИВ) выявил гены tri13 и tri7, ответственные за биосинтез этих токсинов [6]. Таким образом, выявление трихотеценкодирующих генов при помощи специфических праймеров, для диагностики штаммов различных видов *Fusarium*, продуцирующих трихотеценовые токсины является актуальным. Целью работы являлось определение токсиногенности штаммов рода *Fusarium* молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы исследования.

Исследования были проведены в 2024 г. в лаборатории фитопатологии биотехнологического центра ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина». Штаммы, используемые в работе, были выделены из пораженных растений опытных полей учебно-опытного хозяйства Кубань и представлены 4 видами: *Fusarium sporotrichioides* Sherb. (1915), *Fusarium graminearum* Schwabe, 1839, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (1976) и *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg (1982). Видовую идентификацию проводили с помощью методов микроскопирования и определительной литературы [11].

ДНК колоний штаммов была выделена сорбентным методом на магнитных частицах (ЗАО «Синтол», Москва). Амплификацию целевых генов производили с использованием праймерных пар к трихотеценкодирующим генам [6]. Реакцию проводили в трехкратной повторности с использованием реакционной смеси объемом 25 мкл содержащей: 5 мкл 5X qPCRmix-HS SYBR (ООО «Евроген», Москва), 5 пМ каждого праймера, и 50 нг целевой ДНК. Условия ПЦР амплификации для праймерных пар Tri5: 94°C – 1 мин, 68°C – 2 мин, 75°C – 3 мин; 4 цикла. Затем 94°C – 30 с, 68°C – 30 с, 75°C – 1 мин; 36 циклов; Для tri7 и tri13: 94°C – 30 сек, 52°C – 30 сек, 72°C – 1 мин, 30 циклов, с режимом детекции в реальном времени на приборе QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, США) [6].

Результаты исследования и их обсуждения.

В результате проведенных исследований, у четырех из шести изученных штаммов было выявлено наличие трихотеценкодирующих генов (таблица 1).

Таблица 1. Наличие трихотеценкодирующих генов у лабораторных штаммов *Fusarium spp.*

Вид	Заболевание	С/х культура	Трихотеценкодирующие гены		
			tri5	tri7	tri13
<i>F. graminearum</i>	фузариоз колоса	пшеница	-	+	+
<i>F. sporotrichioides</i>	корневая гниль		+	-	-
<i>F. graminearum</i>	фузариоз початка	кукуруза	-	+	-
<i>F. verticillioides</i>			-	-	-
<i>F. sporotrichioides</i>	корневая гниль	яблоня	+	-	-
<i>F. proliferatum</i>			-	-	-

Амплификация целевых фрагментов генов была стабильной, среднее значение Ct равно 28,5 (рисунок 1).

Анализ плавления продуктов амплификации целевых генов tri5, tri7 и tri13 показал отсутствие неспецифической амплификации в исследуемых пробах. Графики кривых плавления отражают специфичность продуктов амплификации для каждого исследуемого вида, что косвенно отражает генетическое сходство исследуемых регионов в рамках вида (рисунок 2).

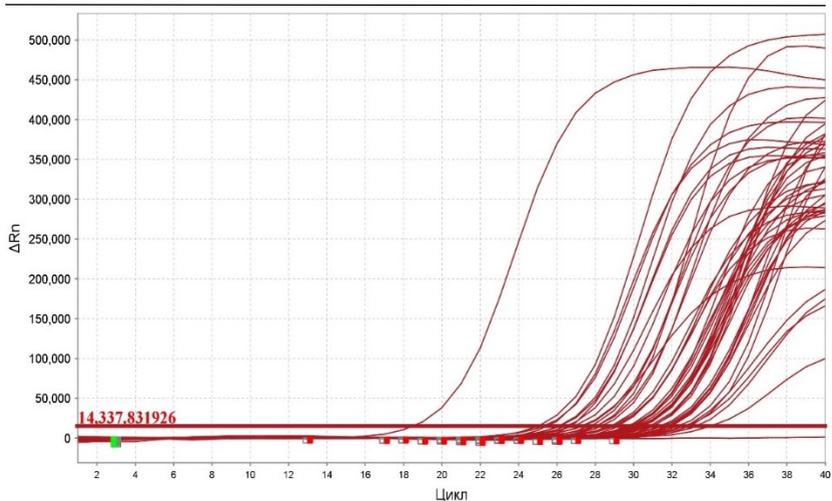


Рис. 1. Графики амплификации целевых фрагментов генов *tri5*, *tri7* и *tri13*

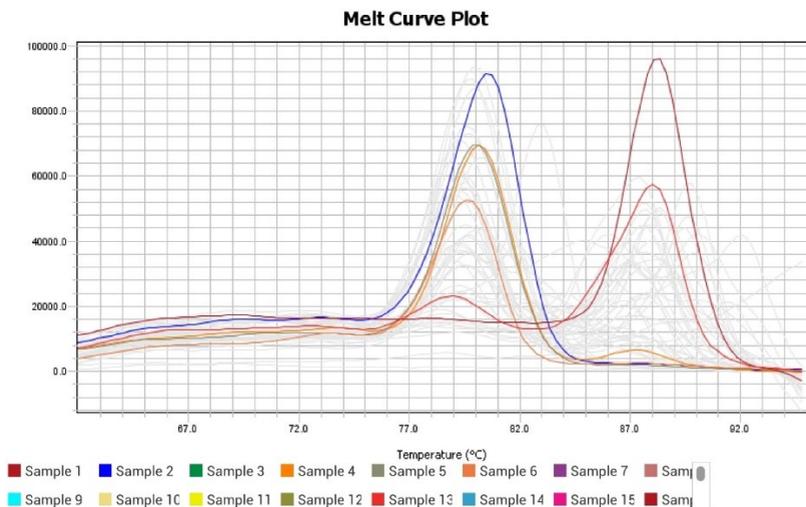


Рис. 2. Графики плавления целевых продуктов амплификации генов *tri5*, *tri7* и *tri13*

Заключение. В результате проведенной генетической оценки лабораторных штаммов *Fusarium spp.* как потенциальных продуцентов микотоксинов, было показано, что два штамма содержат

последовательность ДНК гена триходиенсиназы (*tri5*), два - ДНК гена триходиенсиназы (*tri7*) и один - ДНК гена триходиенсиназы (*tri13*). Результаты данного исследования значимы для оценки риска заражения трихотеценами и могут быть информативными в эпидемиологических исследованиях.

Библиографический список:

1. Костерина, Н. А. Анализ современного состояния проблемы фузариоза колоса и зерна пшеницы в Российской Федерации / Н. А. Костерина // Аграрный вестник Урала. – 2023. – № 5(234). – С. 49-60. – DOI 10.32417/1997-4868-2023-234-05-49-60.

2. Немченко, М. В. Динамика возбудителей агрессивного синергизма на посевах кукурузы / М. В. Немченко, В. П. Сокирко, Р. Д. Невзоров // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: Сборник статей по материалам XI Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 95-летию Кубанского ГАУ и 80-летию со дня образования Краснодарского края, Краснодар, 29–30 ноября 2017 года / Ответственный за выпуск А. Г. Кощаев. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2017. – С. 202-203.

3. Болезни земляники закрытого грунта в Приморье / О. А. Собко, А. С. Дидора, Н. Г. Богинская, Н. В. Мацишина // Овощи России. – 2020. – № 5. – С. 103-107. – DOI 10.18619/2072-9146-2020-5-103-107.

4. Волынчук, Н. Н. Фузариоз винограда: от скрининга до биоконтроля дрожжевыми грибами / Н. Н. Волынчук // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2023. – № 83(5). – С. 116-134. – DOI 10.30679/2219-5335-2023-5-83-116-134.

5. Головин С.Е., Упадышев М.Т. Современные тенденции в защите садов // Защита и карантин растений. – 2017. – № 12. – С. 6-8.

6. Гагкаева Т. Ю. Метод ПЦР-диагностики фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Alternaria* /Т.Ю. Гагкаева, Ф.Б. Ганнибал, О.П. Гаврилова // Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга / Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН. – Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, 2009. – С. 4-14.

7. Артамонов, И. В. Микотоксины фитопатогенных грибов и микотоксикозы: исторический очерк (обзор) / И. В. Артамонов // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2023. – Т. 24, № 5. – С. 703-719. – DOI 10.30766/2072-9081.2023.24.5.703-719.

8. Липницкий А.В., Антонов В.А., Гришина М.А. Молекулярно-генетические подходы к идентификации грибов – продуцентов трихотеценовых микотоксинов (Обзор) / Проблемы медицинской микологии, 2007, Т. 9, № 3 – С. 16-20.

9. Гаврилова, О. П. Выявление спектра микотоксинов, продуцируемых штаммами филогенетически близкородственных видов *Fusarium langsethiae*, *F. Sibiricum* и *F. Sporotrichioides* / О. П. Гаврилова, Т. Ю. Гагкаева, Н. Н. Гогина // Успехи медицинской микологии. – 2022. – Т. 23. – С. 261-265.

10. Сравнение методов выявления в зерне токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium* / Т. Ю. Гагкаева, О. П. Гаврилова, А. С. Орина [и др.] // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51, № 5. – С. 292-298.

11. Д. Саттон, А. Фотергил, М. Ринальди "Определитель патогенных и условно-патогенных грибов" (издательство "Мир", 2001 год).

DETERMINATION OF THE TOXINICITY OF FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* LINK (1809)

Kuznetsova N. A. Fedorovich S.V., Astapchuk I. L.
FSBEI HE Kuban SAU

Keywords: *Fusarium*, toxins, trichotecoding genes

*This article presents data on the evaluation of laboratory strains of *Fusarium* spp. as potential producers of mycotoxins. It has been shown that two strains contain the DNA sequence of the trichodiensynthase gene (*tri5*), two - the DNA of the trichodiensynthase gene (*tri7*) and one - the DNA of the trichodiensynthase gene (*tri13*). The presence of the studied genes may be one of the pathogenesis factors in the most important crops.*