

УДК 632

DOI 10.51691/2541-8327_2023_9_1

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО СОДЕРЖАНИЯ РОДОВ ГРИБОВ *FUSARIUM* И
ALTERNARIA ОСНОВНЫХ ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ КУЛЬТУР НА СЕВЕРЕ
КАЗАХСТАНА**

Байбусенов К.С.

PhD., ассоциированный профессор,

Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.

Сейфуллина,

Астана, Казахстан.

Ажмахан М.А.

Магистр сельскохозяйственных наук, преподаватель,

Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.

Сейфуллина,

Астана, Казахстан.

Джумагулов А.А.

Магистр сельскохозяйственных наук, научный сотрудник,

Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.

Сейфуллина,

Астана, Казахстан.

Коньсбаева Д.Т.

Кандидат биологических наук, доцент,

Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.

Сейфуллина,

Астана, Казахстан.

Аннотация. В статье представлены результаты молекулярно-генетической идентификации филогенетического содержания родов грибов *Fusarium* и *Alternaria* на таких культурах как пшеница, лен, ячмень. На первом этапе исследования изучаемые культуры были микроскопированы с целью установления родовой принадлежности грибной культуры. Была проведена микроскопия с целью установления родовой принадлежности грибной культуры. Далее грибные штаммы были секвенированы. Результаты секвенирования изучаемых штаммов показало, что лен (сорт Лазарь) был заражен видом гриба *Fusarium equiseti*, совпадения составили 100 %. Остальные культуры – ячмень (сорт Сибирь), и пшеница (сорты: Карабалыкская 20 и Астана) были заражены *Alternaria alternata*, совпадения изучаемых штаммов варьировались между 97,43%-98,28%.

Ключевые слова: лен, ячмень, пшеница, микроскопирования, секвенирования, Fusarium, Alternaria.

ANALYSIS OF MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF THE PHYLOGENETIC CONTENT OF THE FUNGAL GENERA FUSARIUM AND ALTERNARIA OF THE MAIN CULTIVATED CROPS IN THE NORTH OF KAZAKHSTAN

Baibusenov K.S.

PhD., Associate Professor

*S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University,
Astana, Kazakhstan.*

Azhimahan M.A.

Master of Agricultural Sciences, teacher,

*S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University,
Astana, Kazakhstan.*

Dzhumagulov A.A.

Master of Agricultural Sciences, Researcher,

*S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University,
Astana, Kazakhstan.*

Konysbaeva D.T.

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor.

*S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University,
Astana, Kazakhstan.*

Annotation. The article presents the results of molecular genetic identification of the phylogenetic content of the fungal genera Fusarium and Alternaria on crops such as wheat, flax, and barley. At the first stage of the study, the studied cultures were microscopized in order to establish the generic identity of the mushroom culture. Microscopy was performed to establish the generic identity of the mushroom culture. Then the fungal strains were sequenced. The results of sequencing of the studied strains showed that flax (Lazarus variety) was infected with a species of Fusarium equiseti fungus, the matches were 100%. The remaining crops – barley (variety Siberia), and wheat (varieties: Karabalykskaya 20 and Astana) were infected with Alternaria alternata, the coincidence of the studied strains varied between 97.43%-98.28%.

Keywords: flax, barley, wheat, microscopy, sequencing, Fusarium, Alternaria.

Введение

Болезни растений – причина значительных (до 25-30%) потерь урожая сельскохозяйственных культур. Заражение семян патогенными видами грибов снижает энергию прорастания и всхожесть. Вредоносность в значительной степени зависит от глубины локализации мицелия гриба и количества пораженных семян. В случае, когда партии зерна идут на продовольственные и кормовые цели, важна не только степень инфицированности, но и видовой состав патогенов. Многие патогенные грибы в процессе роста образуют токсичные вторичные метаболиты (микотоксины), представляющие опасность для здоровья млекопитающих. Основными факторами, определяющими уровень загрязнения зерна микотоксинами, являются степень заражения и видовой состав развивающихся на нем грибов. Грибы р. *Fusarium* продуцируют различные микотоксины, в том числе дезоксиниваленол (ДОН) и Т2 токсин, на которые установлены предельные нормы содержания в зерне и продуктах его переработки – 0,7–2 и 0,1 мг/кг соответственно. Другим распространенным заболеванием злаков является альтернариоз зерна, вызываемый грибами р. *Alternaria*, которые обычно не приводят к существенному снижению количественных показателей урожая зерна, но способны загрязнять сельскохозяйственную продукцию своими метаболитами. У группы видов комплекса *A. Infectoria* известных микотоксинов не выявлено, в то же время несколько часто встречающихся в зерне видов этого рода (*A. tenuissima*, *A. alternata* и др.) продуцируют целый ряд веществ, токсичных для различных организмов, включая растения, бактерии, птиц и млекопитающих, однако в санитарных правилах и нормах они не упоминаются. Несмотря на меньшую токсичность для здоровья человека альтернариотоксинов по сравнению с фузариотоксинами, они могут быть опасны из-за более высокой частоты встречаемости [2, 5].

Грибы рода *Alternaria* широко распространены в посевах зерновых культур. Возбудитель проникает внутрь созревающих семян, а его мицелий скапливается преимущественно в плодовой оболочке и эндосперме, вызывая симптомы черноты зародыша пшеницы и ячменя. Пораженное зерно, как правило, крупное, хорошо выполненное, чем отличается от пораженного гельминтоспориозом. Штаммы *Alternaria spp.* обладают способностью продуцировать токсины, опасные как для растений, так и для человека и животных. Патогенность и токсичность грибов р. *Alternaria*, выделяемых из семян зерновых культур, находится в стадии изучения и в ряде работ ставится под сомнение. В связи с этим весьма актуальным для практики является вопрос обоснованности протравливания семян яровой пшеницы и ячменя против грибов р. *Alternaria* [2].

Фузариоз может обнаруживаться на растениях льна в течение всей вегетации, но наибольший вред причиняет в период от фазы всходов до фазы «ёлочки», вызывая увядание и отмирание растений. Недобор урожая соломы может достигать 60%, семян – 45%, качество длинного волокна снижается на 1-

3 номера. Фузариоз сохраняется в почве, на семенах и инфицированных растительных остатках в форме мицелия, микро- и макроконидий, хламидоспор, склероциев. Распространяется в период вегетации воздушно-капельным путем конидиями [3].

Альтернариоз ячменя - распространенное заболевание, вызванное грибами рода *Alternaria* (*A. alternata* Keissler, *A. tenuissima* Wiltshire, *A. infectoria* Simmons и другие), которые чаще других грибов и бактерий встречаются в семенах зерновых культур. Наиболее опасными видами грибов *Alternaria* являются *A. alternata* и *A. tenuissima*, так как они способны вырабатывать теназоновую кислоту, альтернариол и другие токсины [1].

Цель данного исследования - молекулярно-генетическая идентификация филогенетического содержания родов *Fusarium* и *Alternaria* основных возделываемых культур.

Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии растений кафедры «Биология, защита и карантин растений» НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им.С.Сейфуллина в рамках проекта (5П/23) «Разработка и совершенствование интегрированных систем защиты плодовых, овощных, зерновых, кормовых, бобовых и карантина растений».

Объект и методы исследований

Объектами исследований послужили сорта Лазарь (Лен), Сибирь (ячмень), Карабалыкская 20 (пшеница), Астана (пшеница).

Выделение ДНК проводили готовым набором GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) использовался протокол для выделения ДНК. Концентрация ДНК варьировалась от 6,7-74,8134,5 нг/мкл. Продукт гена Alt a1 длиной 568 п.н. амплифицировали с использованием следующих пар праймеров Alt-for/Alt-rev (Hong et al. 2005) [6].

Для амплификации маркерного участка в общем объеме 25 мкл готовится смесь, содержащая 25 нг ДНК, 1U ДНК полимеразы (Thermo Scientific, США), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР выполняется на амплификаторе SimpliAmp, (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле в камере для горизонтального электрофореза Max NU10, и источником тока «Consort EV 243». В качестве электродного буфера используется 1х ТАЕ-буфер. Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали с помощью метода Сэнгера [4] с использованием набора для определения последовательности терминатора BigDye в соответствии с расчетом на общий объем 25 мкл для каждой пробы – дН₂O – 18 мкл, 5х буфера – 5 мкл, BigDye – 0,5 мкл, праймер – 0,5 мкл, ПЦР-продукт – 1 мкл. Последовательности праймеров использовали такие же, как и для ПЦР. Для обеспечения точности секвенирования амплифицированные фрагменты секвенировали с двумя праймерами: прямым и обратным. Продукты секвенирования изучали на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США). Анализ и редактирование

Дневник науки | www.dnevniknauki.ru | СМН ЭЛ № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

хроматограммы проводили с использованием Sequencing Analysis 5.2, Patch 2 (Applied Biosystems, США). Полученные результаты обрабатывали в базе данных на сайте www.ncbi.com.

Результаты исследований

На первом этапе была проведена микроскопия с целью установления родовой принадлежности грибной культуры. Ниже на рисунке 1 представлены результаты микроскопии:

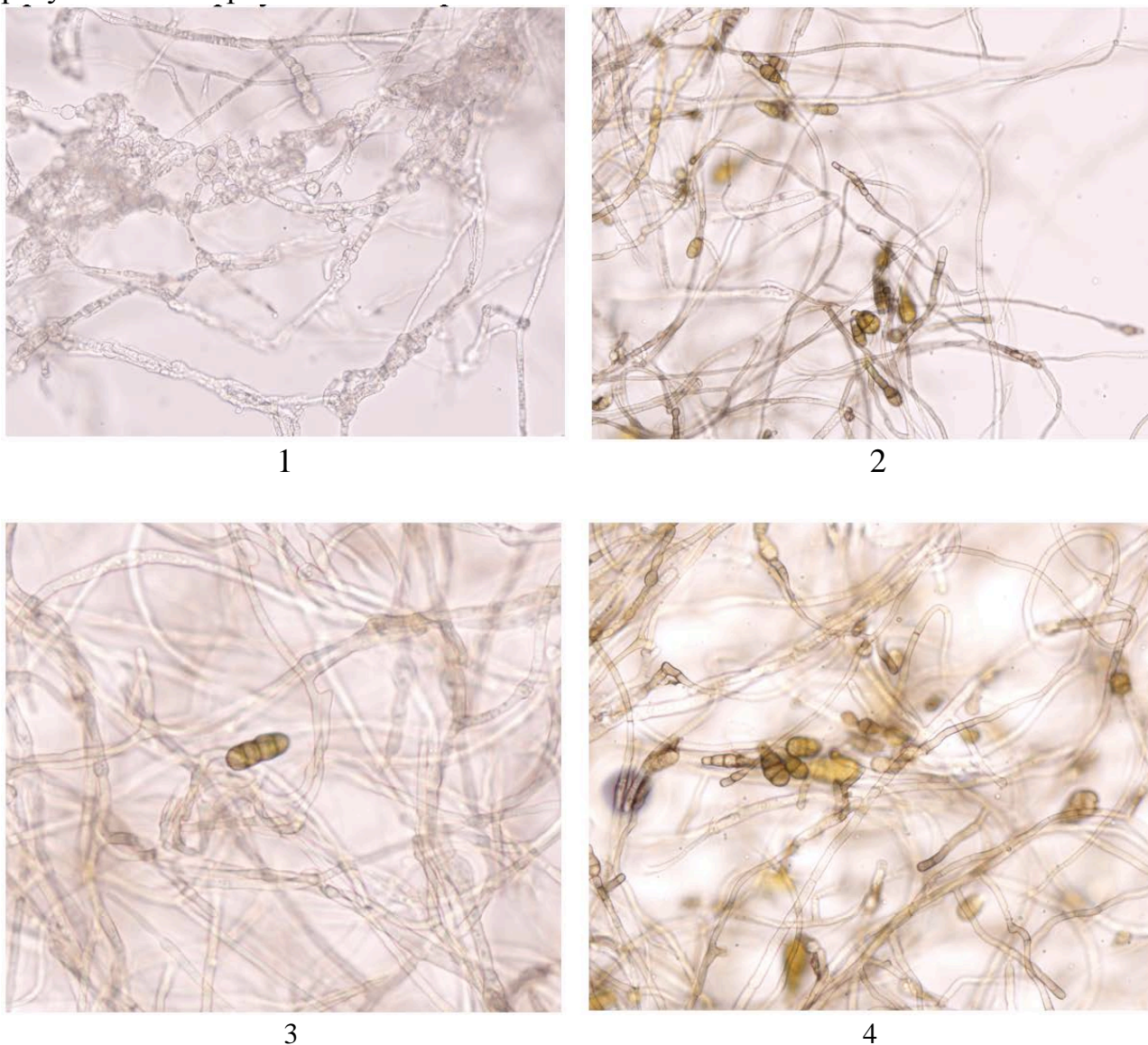


Рисунок 1 – Результаты микроскопии: 1 – Лен Лазарь; 2 – ячмень Сибирь; пшеница –; 4 – пшеница

Учитывая микроскопическое строение изученных грибных штаммов, исследование показало, что изолят сорта Лазарь (лен) принадлежит к виду *Fusarium spp.*; образцы из сортов Карabalыкская 20, Астана (пшеница) и Сибирь (ячмень) принадлежат к роду *Alternaria spp.*

Далее были проведены исследования изучаемых штаммов на молекулярно-генетическом уровне. Результаты молекулярно-генетического анализа методом секвенирования alt участка генома представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты секвенирования изучаемых штаммов.

№	Последовательность	Название	% совпадения
1	TGATCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCG ACGATTACCAGTAACGAGGTGTATGATTACTACGCTATGGAAGCTC GACGTGACCGCCAATCGATTTGGGGAACGCGGGTTACCGCGAGTC CCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGG CATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC GATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA CTTATCGCATTTTGCT GCGTTCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT TTGATTTATTTGTTTGTCTTACTCAGAAGTTCCACTAAACCGTCCCT TTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGAGGCAACGTATAGGTATGTTCA CAGGGGTTTCGCTGGTTCACCAACGGAGAC	<i>Fusarium equiseti</i>	100
2	TGCCGTGTGCGACTCATCCAAAACGTCGGGAAGAGCTC CGAATTCTACGGACGCCAGCCGGAAGGACCTACTACAA CAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCCACCAACGGAGGA ACCCTCGACTTCACCTTGTCTTTCTCAGGCCGATAAGCT TGACGACCACAAGTGGTACTCCTGTGGCGAGAACAGCT TCATGGACTTCTCTTTCGACAGCGACCGCAGCGGTCTG CTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGAGTAAGTTACCCT TGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACTAACA TATCCCAGCATCACCTATGTGCTACCGCCACTCTTCC CAACTACTGCCGCGCTGGCGGTAACG	<i>Alternaria alternata</i>	97,43%
3	AGCAGCTTGTGCGTCGCAGCATCGCTGCGTTCTCGCAG CGTTGCAGCTTGCCGTGTGCGACTCATCCAAAACGTCG GGAAGAGCTCCGAATTCTACGGACGCCAGCCGGAAGG ACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCCAC CAACGGAGGAACCCTCGACTTCACCTTGTCTTTCTCAG GCCGATAAGCTTGACGACCACAAGTGGTACTCCTGTGG CGAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTTCGACAGCGACC GCAGCGGTCTGCTCCTGAAGCAGAAGGTTAGCGACGA GTAAGTTACCCTTGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCA GATATACTAACATATTCCCAGCATCACCTATGTCGCTA CCGCCACTCTTCCAACTACTGCCGCGCTGGCGGTAAC GGCCCTAAGGATTTTGTCTGCCAGGGTGTGCCGACGC CTACATCACCTCGTAGGGAGGCCTTGGAAGGGGAAA AAGGGGGGGGGGAAATGGATACACATTGGGGGTGAA ATGGGTAA	<i>Alternaria alternata</i>	97,52%
4	ССАСТТГААСТАСТАСТТГГААГАТТТССАГТТТСТАС ГГАСГСААГААГГАГГГГААСТТАСТААААСГССТС ГГСТТСААААТСААГГСТАССАААСГААААСТСГАС ТТАССТГСТТСТТСТСАСССААААГСТТГААААА САСТТГГААСТТТГСГГСГААААААААААААААА ТСТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ СААААААААААААААААААААААААААААААА ГАТТАСТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ	<i>Alternaria alternata</i>	98,28%

GCATCACSTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACT GCCGCGCTGGGGTAACGGCCCTAAGGACTTTGTCTGCC AGGGTGTGCGCGACGCCTACATCACCCCTCGTAAGCTTG GTGACTGCTACGATGGTGGTGAACCTGCATACGATGGTG GTGAACTGGATACGATGGTGGGAACTGCATACGATGTG GTGAACTGCATAACAGGTGGGAACTGATACGAGGTG		
---	--	--

В результате молекулярно-генетической идентификации филогенетического содержания родов *Fusarium* и *Alternaria* из четырех исследованных изолятов лен (сорт Лазарь) был заражен видом *Fusarium equiseti*, его совпадения составили 100 %. У остальных изолятов был выявлен *Alternaria alternata* в разных совпадениях: ячмень (сорт Сибирь) 97,43%, пшеница сорта Карабалыкская 20 - 97,52 % и Астана - 98,28%.

Заключение

Фузариоз и Альтернариоз несут в себе скрытую угрозу человеку и животным. Ранняя идентификация инфекционных семян предотвратит недобор урожая и ухудшение пищевых и кормовых качеств продукции. Изучение молекулярно-генетической идентификации родов *Fusarium* и *Alternaria* на данный момент актуально. Большое значение для сохранения и повышения урожая льна и зерновых культур имеет правильно организованная защита растений от данных болезней.

Библиографический список

1. Альтернариоз ячменя. Компания Кроп Протекшн [Электронный ресурс] URL: <https://www.crop-protection.ru/bolezni-rastenyi/alternarioz/alternarioz-yachmenya.html> (Дата обращения: 18.09.2023).
2. Гагкаева Т.Ю., Ганнибал Ф.Б., Гаврилова О.П. Зараженность зерна пшеницы грибами *Fusarium* и *Alternaria* на юге России в 2010 г. // Защита и карантин растений. 2012. № 1. С. 37–41
3. Сулейменова А.К. Устойчивость сортов льна маслиничного к фузариозному увяданию // Международный сельскохозяйственный журнал 2018. № 4 (364). С.41-43
4. De Maio N, Shaw LP, Hubbard A, George S, Sanderson ND, Swann J, Wick R, AbuOun M, Stubberfield E, Hoosdally SJ, Crook DW, Peto TEA, Sheppard AE, Bailey MJ, Read DS, Anjum MF, Walker AS, Stoesser N, On Behalf Of The Rehab Consortium. Comparison of long-read sequencing technologies in the hybrid assembly of complex bacterial genomes // Microb Genom. 2019. 5(9). URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000294>
5. Hadizadeh, I., Peivastegan, B. & Hamzehzarghani, H. (2009). Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternate*. *American Journal of Applied Sciences*, 6(5), 857-861. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2009.857.861>

6. Hong, S.G. et al. Alt a1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure // *Fungal Genetics and Biology*. 2005. Vol.42. Issue 2. P. 119-129. doi:10.1016/j.fgb.2004.10.009

Оригинальность 82%