

А. А. БАРЕЙКО, А. В. КАНТЕРОВА, А. В. СИДОРЕНКО

**РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ
ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *PENICILLIUM OLSONII***

Институт микробиологии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь,
bareiko.hanna@gmail.com

На основе нуклеотидной последовательности гена *benA*, кодирующего β -тубулин, разработаны видоспецифичные праймеры для ПЦР-диагностики фитопатогенного гриба *Penicillium olsonii*. Подтверждена специфичность сконструированных праймеров и возможность их использования для детекции *P. olsonii* с помощью стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени.

Ключевые слова: *Penicillium olsonii*, болезни растений, ПЦР-диагностика.

Ежегодные потери урожая сельскохозяйственных культур от болезней, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами, в развитых странах составляют около 10%, в развивающихся странах достигают 20-50% [10]. Некоторые инфекционные болезни растений проявляются не на стадии вегетации и плодоношения, а в период хранения, что приводит к дополнительным экономическим потерям.

Среди патогенов, вызывающих порчу овощей при хранении, выделяют обширную группу мицелиальных грибов рода *Penicillium*, насчитывающего порядка 200 видов [4]. Долгое время основными патогенами растений считались *Penicillium expansum* и *Penicillium digitatum* [7], однако в последние годы отмечается поражение сельскохозяйственных культур и другими представителями этого рода. Так, у *Penicillium olsonii*, ранее относившегося к сапрофитным обитателям тропических почв, выявлена способность вызывать пятнистость и плодовую гниль томата. Симптомы заболевания, вызываемого *P. olsonii*, начинают проявляться через 3-4 месяца в зависимости от сорта растения и условий хранения. Данный микроорганизм как патоген обнаружен в 2009-2010 гг. в тепличных хозяйствах Канады [3], в 2015 г. – в Иране [5], а в 2021 г. – в Сербии [9]. Сведения о распространении фитопатогенных грибов *P. olsonii* в Республике Беларусь и странах СНГ до настоящего времени отсутствуют.

Расширение спектра и ареала распространения фитопатогенных микроорганизмов, а также необходимость постоянного мониторинга фитосанитарного состояния теплиц и сельскохозяйственных предприятий на территории Республики Беларусь, актуализируют исследования, направленные на разработку специфичных и чувствительных способов детекции патогенов растений.

Целью работы являлась разработка видоспецифичных праймеров для ПЦР-диагностики грибов *P. olsonii*.

Дизайн видоспецифичных праймеров осуществляли с использованием последовательностей гена *benA*, кодирующего β -тубулин, грибов вида *P. olsonii*, представленных в базе данных NCBI [2]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма Нидельмана-Вунша, реализованного в программе SnapGene [8]. Подбор праймеров проводили вручную. Анализ структуры, термодинамических параметров и проверку специфичности сконструированных праймеров к определенным видам фитопатогенных грибов *in silico* осуществляли с помощью программы PrimerBlast [6].

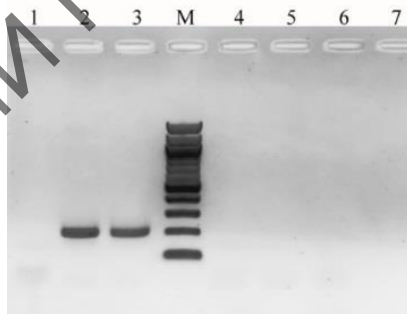
Для тестирования специфичности праймеров *in vitro* использовали культуры мицелиальных грибов, депонированные в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов: *P. olsonii* БИМ F-801, БИМ F-813, БИМ F-815; *P. brevicompactum* БИМ F-812; *P. expansum*

БИМ F-39, БИМ F-171; *P. chrysogenum* БИМ F-281; *Talaromyces purpureogenus* БИМ F-40, БИМ F-152; *Aspergillus flavus* БИМ F-1, БИМ F-172. Стандартную ПЦР проводили на амплификаторе SureCyler 8800 (Agilent). Реакционная смесь, объемом 20 мкл, содержала: «2× премикс для ПЦР-РВ» (Праймтех) – 10 мкл, прямой и обратный праймеры (4 пмоль) – 1,5 мкл, образец ДНК – 2 мкл, вода для ПЦР – до 20 мкл. Образцы ДНК и продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле с использованием 1× трис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). В качестве стандарта для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы фрагментов ДНК «GeneRuler DNA Ladder Mix» (ThermoFisher Scientific). ПЦР в режиме «реального времени» проводили на амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad). В состав реакционной смеси (объем 25 мкл) входили: «2× премикс для ПЦР-РВ» (Праймтех) – 12,5 мкл, прямой и обратный праймеры (7 пмоль) – 1 мкл, интеркалирующий краситель ZUBR Green-1 (Праймтех) – 0,13 мкл, образец ДНК – 5 мкл, вода для ПЦР – до 25 мкл.

На основании данных литературы в качестве диагностического локуса для конструирования видоспецифичных праймеров выбран ген *benA*, кодирующий β-тубулин. Этот ген является высококонсервативным, однако имеет варибельные участки, позволяющие дифференцировать близкородственные виды *Penicillium* [1]. С помощью компьютерного анализа пяти референсных последовательностей гена *benA* *P. olsonii*, а также их сравнения с последовательностями гена *benA* близкородственного вида *P. brevicompactum*, определены участки, относительно консервативные для *P. olsonii* и по своим параметрам (ГЦ-состав, длина) подходящие для подбора праймеров.

Сконструирована пара видоспецифичных праймеров P_{ols_F} (5'-TGACTCAAAGGCAAAC-3') и P_{ols_R} (5'-TGGGAGGTCAAAGACAT-3'), окаймляющих фрагмент гена *benA* длиной 225 п. н. Небольшой размер целевого ампликона позволяет сократить время амплификации и проводить детекцию продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Анализ праймеров P_{ols_F} и P_{ols_R} *in silico* с помощью программы Primer-BLAST показал наличие продуктов амплификации только с хромосомной ДНК разных штаммов *P. olsonii*, что подтверждает их специфичность.



М – маркер молекулярного веса ДНК; 1 – отрицательный контроль ПЦР;
2 – *P. olsonii* БИМ F-813; 3 – *P. olsonii* БИМ F-815, 4 – *P. brevicompactum* БИМ F-812;
5 – *P. expansum* БИМ F-39; 6 – *A. flavus* БИМ F-172; 7 – *T. purpureogenus* БИМ F-152

Рисунок – Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами P_{ols_F} и P_{ols_R}

С использованием хромосомной ДНК коллекционных штаммов *P. olsonii* БИМ F-801, F-813, БИМ F-815 оптимизированы температурно-временные параметры стандартной ПЦР с праймерами P_{ols_F} и P_{ols_R}: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 20 с; 72°C – 5 мин; 4°C – 5 мин. Показано, что при проведении ПЦР с праймерами P_{ols_F} и P_{ols_R} ампликоны целевого размера образуются только для грибов *P. olsonii* БИМ F-801, БИМ F-813, БИМ F-815, продукты амплификации с ДНК *P. brevicompactum* БИМ F-812; *P. expansum*

БИМ F-39, БИМ F-171; *P. chrysogenum* БИМ F-281; *T. purpureogenus* БИМ F-40, БИМ F-152; *A. flavus* БИМ F-1, БИМ F-172 отсутствуют (рисунок, данные приведены для отдельных культур). Полученные данные свидетельствуют о специфичности праймеров к грибам *P. olsonii*.

В последние годы для детекции фитопатогенных микроорганизмов широкое применение находит ПЦР в реальном времени. Основным преимуществом данного подхода перед стандартной ПЦР является более высокая чувствительность и скорость анализа. Оптимизированы температурно-временные параметры ПЦР в реальном времени с праймерами P_{ols_F} и P_{ols_R}: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 20 с, 60°C – 15 с, 72°C – 10 с; кривая плавления: 60°C – 15 с; 95°C – 5 с.

При проведении ПЦР в реальном времени с праймерами P_{ols_F} и P_{ols_R} ДНК *P. olsonii* БИМ F-801, БИМ F-813, БИМ F-815 выявлялась при пороговом цикле 23-24, а ДНК грибов близкородственных видов (*P. brevicompactum* БИМ F-812; *P. expansum* БИМ F-39, БИМ F-171; *P. chrysogenum* БИМ F-281; *T. purpureogenus* БИМ F-40, БИМ F-152; *A. flavus* БИМ F-1, БИМ F-172) детектировалась незначительно позже – после 27 цикла (таблица). Анализ кривых диссоциации показал, что температура плавления специфических продуктов, полученных для *P. olsonii* БИМ F-801, БИМ F-813, БИМ F-815, значительно отличается от температуры плавления неспецифических продуктов, характерных для *P. brevicompactum* БИМ F-812; *P. expansum* БИМ F-39, БИМ F-171; *P. chrysogenum* БИМ F-281; *T. purpureogenus* БИМ F-40, БИМ F-152; *A. flavus* БИМ F-1, БИМ F-172. Представленные результаты свидетельствуют, что праймеры P_{ols_F} и P_{ols_R} могут использоваться для детекции *P. olsonii*.

Таблица – Проверка специфичности праймеров P_{ols_F}/P_{ols_R} методом ПЦР в реальном времени

Штамм	Пороговый цикл	Детекция <i>P. olsonii</i>
<i>P. olsonii</i> БИМ F-801	23	+
<i>P. olsonii</i> БИМ F-813	23	+
<i>P. olsonii</i> БИМ F-815	24	+
<i>P. brevicompactum</i> БИМ F-812	>27	-
<i>P. expansum</i> БИМ F-39	>27	-
<i>P. expansum</i> БИМ F-171	>27	-
<i>P. chrysogenum</i> БИМ F-281	>27	-
<i>A. flavus</i> БИМ F-1	>27	-
<i>A. flavus</i> БИМ F-172	>27	-
<i>T. purpureogenus</i> БИМ F-40	>27	-
<i>T. purpureogenus</i> БИМ F-152	>27	-

Таким образом, сконструированные праймеры P_{ols_F} и P_{ols_R} являются специфичными к грибам *P. olsonii* и могут использоваться для их детекции с помощью стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, что расширяет диагностический инструментарий для мониторинга фитосанитарной ситуации в Республике Беларусь, своевременного выявления и профилактики инфекционных болезней сельскохозяйственных культур.

Список литературы

- 1 A re-evaluation of *Penicillium* section *Canescentia*, including the description of five new species / C. M. Visagie [et al.] // *Persoonia – Mol. Phyl. Evol. Fungi.* – 2021. – V. 46. – P. 163–187. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.06>.
- 2 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Electronic resource] – NCBI, 2020. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> – Date of access: 26. 12. 2021.

3 Chatterton, S. Fruit infection and postharvest decay of greenhouse tomatoes caused by *Penicillium* species in British Columbia / S. Chatterton, A. C. Wylie, Z. K. Punj // Can. J. Plant Pathol. – 2012. – V. 34, № 4. – P. 524–535. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.710069>.

4 Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* / C. M. Visagie [et al.] // Stud. Mycol. – 2014. – V. 78. – P. 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

5 Five new species of *Penicillium* and *Talaromyces* for mycobiota of Iran / A. Khodaei. [et al.] // Rostan. – 2015. – V. 16, № 2. – P. 186–199. <https://doi.org/10.22092/BOTANY.2016.105987>.

6 PrimerBlast [Electronic resource] – NCBI, 2020. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> – Date of access: 26. 12. 2021.

7 Rosario, D. L. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global post-harvest pathogen causing blue mould of pome fruit / D. L. Rosario, N. P. Keller, W. M. Jurick // Mol Plant Pathol. – 2020. – V. 21, № 11. – P. 1391–1404. <https://doi.org/10.1111/mpp.12990>.

8 SnapGene [Electronic resource] – Insightful Science, 2020. – Mode of access: <http://www.snapgene.com/>. – Date of access: 26. 12. 2021.

9 Živković, S. First report of *Penicillium olsonii* causing postharvest fruit rot on tomato in Serbia / S. Živković, D. Ristić, S. Stošić // Plant Dis. – 2021. – V. 105, No. 8. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0323-PDN>.

10 Федоренко, В. Ф. Перспективные технологии диагностики патогенов сельскохозяйственных растений: науч. анализ. обзор. / В. Ф. Федоренко, Н. П. Мишуров, Л. А. Неменуцкая. – М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2018. – 68 с.

H. A. Bareika, H. V. Kanterava, A. V. Sidarenka

PRIMER DEVELOPMENT FOR PCR DIAGNOSTICS OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI *PENICILLIUM OLSONII*

*The Institute of Microbiology NAS of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus,
bareiko.hanna@gmail.com*

*Abstract. Species-specific PCR primers were developed based on the sequence of β -tubulin encoding gene *benA* for detection of phytopathogenic fungi *Penicillium olsonii*. Primers specificity and potential for *P. olsonii* detection in conventional and real-time PCR were confirmed.*

Keywords: Penicillium olsonii, plant disease, PCR diagnostics.

УДК 543. 321:628. 112:546. 131:631. 4(476. 2-21 Гомель)

Д. В. БОРИСЕНКО, М. С. РУДЕНКО, Н. С. РЯБЧЕНКО

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕСТКОСТИ И СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРИДОВ В РОДНИКОВОЙ ВОДЕ И ПОЧВАХ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ ГОРОДА ГОМЕЛЯ

*Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины,
г. Гомель, Республика Беларусь,*

borisenk2011@mail.ru, mariarydenko962@gmail.com, ryabchenko_nadezhda@mail.ru

Анализируются пробы родниковых вод на содержание хлоридов и карбонатов в осенний и весенний период. Данные исследования проводились методом титрования для жидкости и рентгенофлуоресцентный анализ для грунта. Изучены так же образцы водной вытяжки