

УДК: 575:633.15:113:027.2

О. О. Дерев'яно<sup>1</sup>, асп., Н. Е. Кожухова<sup>1</sup>, канд. біол. наук,  
О. В. Бабаянц<sup>2</sup>, канд. біол. наук, Ю. М. Сиволап<sup>1</sup>, докт. біол. наук,  
академік УААН.

<sup>1</sup> Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН и МОНУ,  
Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна; e-mail: natavolk@ Rambler.ru

<sup>2</sup> Селекційно-генетичний інститут УААН,  
Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОПУЛЯЦІЙ *FUSARIUM SPP.* ПІВДЕННОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ

Здійснено ISSR- і ДП-ПЛР аналіз міжвидового та внутрішньовидового поліморфізму грибів роду *Fusarium*. Рівень поліморфізму серед видів *Fusarium* — 100 %, в межах вибірки *F. moniliforme v. lactis* — 49 % і *F. gibbosum v. acuminatum* — 48 %, що свідчить про широку мінливість досліджуваного об'єкту. В цілому не відзначено відповідності між кластеризацією штамів за даними ДНК-профілювання і рівнем патогенності, хоч і спостерігається така тенденція при розгляді окремих кластерів.

**Ключові слова:** ПЛР-аналіз, між- та внутрішньовидовий поліморфізм, *F. moniliforme v. lactis*, *F. gibbosum v. acuminatum*

Давно відомою, але до цього часу не вирішеною є проблема втрат урожаю від фузаріозу (до 50 %), що викликається грибами роду *Fusarium*. Зростає з кожним роком зниження кількості і якості врожаю, а також підвищення вірогідності отруєння людини [1] і тварин [2] мікотоксинами, що знаходяться в їжі, інфікованій цими грибами, вимагає все більш поглибленого вивчення фузаріозів, вияв яких знаходиться в залежності від зовнішніх чинників, від генотипів рослин, і, головне, від генотипів фузарієвих грибів.

На наш погляд, необхідно знати загальний потенціал патогенності, закладений в генетичному матеріалі, який дозволяє прогнозувати можливу шкідливість фітопатогенів і розробити надійні заходи боротьби з ними. Потенціал патогенності можна виявити шляхом вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму за допомогою методів, основаних на профілюванні ДНК, зокрема шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [3—5]. Використання молекулярних маркерів дозволяє виявити і оцінити структуру генетичних локусів досліджуваних організмів — грибів роду *Fusarium* — на будь-якій стадії їх розвитку з високою точністю і відносно швидко [6].

Мета нашої роботи полягала у вивченні молекулярно-генетичної різноманітності популяцій *Fusarium spp.*, що вражають злакові культури південного регіону України. Виходячи з поставленої мети, визначили наступні задачі: з'ясувати міжвидовий поліморфізм грибів роду

*Fusarium*; вивчити внутрішньовидовий поліморфізм *F. moniliforme* v. *lactis*, як найбільш шкідливого для кукурудзи (*Zea mays* L.), і *F. gibbosum* v. *acuminatum*.

### Матеріал і методи дослідження

Штами *Fusarium*. Матеріалом для дослідження міжвидового поліморфізму слугували вісім видів і шість різновидів грибів роду *Fusarium*, належних до різних секцій (секція *Discolor*: *F. gibbosum* v. *acuminatum*, *F. gibbosum* v. *bullatum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. macroceras*; секція *Elegans*: *F. moniliforme* v. *lactis*, *F. moniliforme* v. *subglutinans*, *F. oxysporum* v. *orthoceras*; секція *Sporotrichiella*: *F. sporotrichiella* v. *tricinctum*; секція *Roseum*: *F. avenaceum*) і один вид вищих грибів — *Pleurotus ostreatus* (контроль). Внутрішньовидовий поліморфізм вивчали на вибірці, що включає 18 штамів *F. moniliforme* v. *lactis* (Pir. et Rib.) Bilai (номери та характеристика штамів: *st13*, *st50/x* — непатогенні; *st52*, *st55*, *st118/1*, *st118/2*, *34/17*, *m/z*, *kk* — слабкопатогенні; *st53* — помірнопатогенний; *st202*, *st266*, *kl* — патогенні; *st82*, *st54*, *st82/5*, *st94m*, *st122* — високопатогенні) і 18 штамів *F. gibbosum* v. *acuminatum* (El. et Ev.) Bilai, виділені в чисту культуру з інфікованих качанів кукурудзи і зерен пшениці [7]. Всі штами вирощували з однієї конідії. Кожний штам досліджували в трьох повторюваннях, тобто досліджували три моноспорові культури, вирощені на картопляному агарі (на 1 л води — 500 г картоплі, 10 г цукру, 20 г агару, рН 4,7) протягом 14 діб при 24 °С.

**Виділення ДНК** з міцелію проводили згідно СТАВ-протоколу [8].

**ISSR-ПЛР** здійснювали на ампліфікаторі "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія) в наступному режимі: початкова денатурація — 94 °С, 2 хв; далі 30 циклів: 94 °С, 30 сек; 55 °С, 30 сек; 72 °С, 1 хв; заключна елонгація — 72 °С, 2 хв.

**ДП-ПЛР** (довільно праймована ПЛР) проводили на тому ж приладі, але при більш м'якій температурі відпалу: початкова денатурація — 93 °С, 2 хв; 30 циклів: 93 °С, 30 сек; 52 °С, 30 сек; 72 °С, 1 хв; заключна елонгація — 72 °С, 2 хв.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: буфер (50 mM KCl, 20 mM трис-HCl рН 8,4 (25 °С), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % твин-20); 0,2 mM кожного dNTP; 0,2 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 одиницю ДНК-полімерази Taq. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінерального масла.

Кодування і послідовності (5' > 3') праймерів наступні: P58 — GAGGGGTTTCGAGGCC; P74 — TAGCSTATTTGGGCCGCC; P76 — CCCACAAAGAAAGCAATGG; P90 — CTGGGGTTGGTTCTGG; P93 — GGGTGGCGTGGGGTG; G — (GA)<sub>9</sub>C; F82 — (GCAG)<sub>4</sub>; F83 — (CTC)<sub>2</sub>(TCC)<sub>2</sub>ACGATCAC; F84 — (GAG)<sub>6</sub>; F85 — (GAC)<sub>6</sub>.

**Електрофоретичний розподіл** продуктів ампліфікації проводили в горизонтальному "підводному" 2 % агарозному гелі розміром 20,0 × 15,0 × 0,5 см в приладі фірми "Hoefler Scientific Instruments"

(США) в ТВЕ-буфері при 55 В 3 години за кімнатної температури. ДНК візуалізували фарбуванням бромистим етидієм; гелі фотографували з використанням світлофільтру ОС-12 в ультрафіолетовому світлі (300 нм) на плівку "Мікрат-300". Електрофоретичні профілі ампліфікованої ДНК оцінювали візуально і кодували бінарно: наявність/відсутність смуги позначали "1"/"0" відповідно. Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК одержували за допомогою системи документації і аналізу електрофорезних гелів Image Master VDS ("Amersham Pharmacia Biotech", Великобританія).

**Кластерний аналіз.** Встановлення генетичних дистанцій згідно коефіцієнту SM і графічну побудову дендрограми генотипів на основі даних електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "TREE 4.0" [9].

Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках як відношення поліморфних ПЛР-ампліконів до загального числа ПЛР-ампліконів, що детектують.

$P = n_p / (n_p + n_{np}) \times 100 \%$ , де  $n_p$  — число поліморфних ПЛР-ампліконів, а  $n_{np}$  — число неполіморфних ПЛР-ампліконів.

### **Результати досліджень та їх обговорення** **Вивчення міжвидового поліморфізму грибів роду *Fusarium***

Використання ПЛР з 10 одиничними праймерами дозволило унікально диференціювати досліджені зразки. Спектри ампліфікації ДНК включали від 22 до 40 компонентів, середнє число яких склало 30,1 на праймер. Проаналізовано 1270 ампліконів (115,45 — середня кількість ампліконів, що генерується при використанні одного праймера). Враховували тільки мажорні фрагменти, відтворювані за повторної ампліфікації. Міжвидовий поліморфізм склав 100 %. В роботі Xu R. та ін. [5] по вивченню міжвидової різноманітності рівень поліморфізму між *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* і *F. graminearum* склав 95 %.

За сумарними даними ПЛР-аналізу проведено розрахунок генетичних дистанцій і кластеризація досліджених видів (рис. 1). Значення генетичних дистанцій варіювали від 0,210 до 0,626. Генетична подібність між *F. culmorum* і *F. graminearum* склала 50 %, тоді як в роботі Xu R. та ін. [5] — 80 %. Найменший ступінь подібності спостерігали у видів *F. graminearum* і *F. macroceras*. Максимальну величину генетичної дистанції визначено між *Pleurotus ostreatus* і кластером, об'єднуючим всі види і різновиди *Fusarium*, що демонструє розподіл відділу грибів на вищі і нижчі.

Кластеризація штамів за даними ПЛР-аналізу в основному співпадає з результатами очікуваного згрупування штамів по секціях (рис. 1).

На попередньому етапі роботи досліджували по одному штаму певних видів і різновидів. В подальшому для відображення цілісної картини молекулярно-генетичного "стану" популяцій у конкретній

еколого-географічній зоні вибірку штамів збільшували. При розширенні внутрішньовидової вибірки (по 18 штамів кожного виду) виявлено значне варіювання в межах *F. gibbosum v. acuminatum* і *F. graminearum* і відносну однорідність *F. moniliforme v. lactis* і *F. oxysporum v. orthoceras* (дані не приведені).

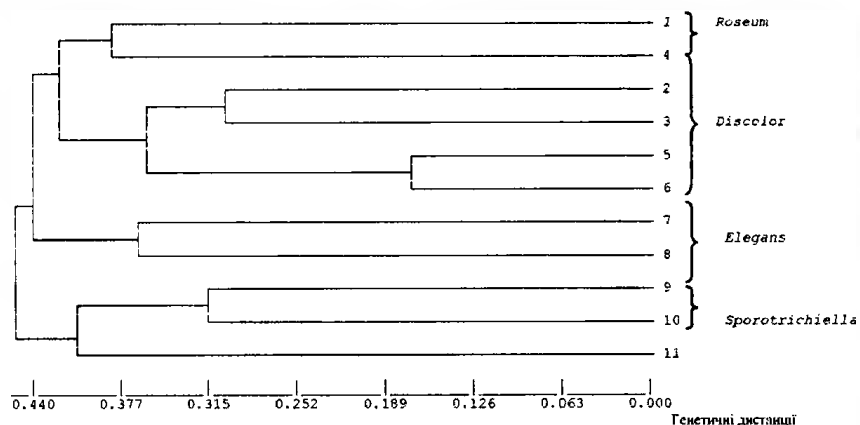


Рис. 1. Дендрограма молекулярно-генетичної подібності між видами і різновидами грибів роду *Fusarium*. 1 — *F. avenaceum*, 2 — *F. culmorum*, 3 — *F. gibbosum v. acuminatum*, 4 — *F. gibbosum v. bullatum*, 5 — *F. graminearum*, 6 — *F. macroceras*, 7 — *F. moniliforme v. lactis*, 8 — *F. moniliforme v. subglutinans*, 9 — *F. oxysporum v. orthoceras*, 10 — *F. sporotrichiella v. tricinctum*, 11 — *Pleurotus ostreatus*

Таким чином, для з'ясування міжвидових молекулярно-генетичних взаємостосунків необхідне вивчення внутрішньовидового поліморфізму з метою виявлення найбільш типових представників для еталонних досліджень і для оцінки мінливості кожного виду і різновиду.

### Вивчення внутрішньовидового поліморфізму *F. moniliforme v. lactis*

Внутрішньовидову молекулярно-генетичну різноманітність *F. moniliforme v. lactis* досліджували на прикладі восьми штамів, що розрізняються рівнем патогенності. Використання ПЛР з восьмима довільними праймерами дозволило диференціювати досліджені штами. Спектри ампліфікованої ДНК включали від чотирьох до десяти компонентів, середня кількість ПЛР-фрагментів на праймер склала 7,1. Проаналізовано 199 ампліконів, із яких 191 — поліморфні.

На дендрограмі досліджених штамів *F. moniliforme v. lactis* утворилися два кластери (рис. 2).

В перший кластер входить субкластер, що містить два слабкопатогенних штами *st52* і *st55* і штама — стимулятор росту сільськогосподарських рослин (штама *st13*). Крім того, перший кластер має один помірнопатогенний штама *st41*. У другому кластері знаходяться два високопатогенних штами *st82* і *st122* і один штама *st53* з середнім рівнем патогенності, який вище такого у помірнопатогенного штама

*st41*, що знаходиться в першому кластері. В жоден кластер не ввійшов високопатогенний штам *st81*, який виявляв максимальну дистанцію від решти штамів. Кластеризація штамів за даними ПЛР-аналізу взагалі співпадала з результатами очікуваного згрупування штамів за рівнем патогенності.

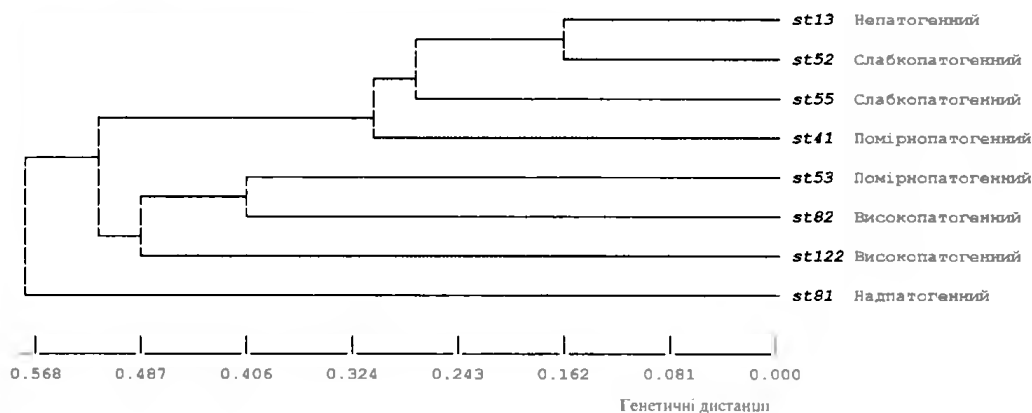


Рис. 2. Дендрограма феногенетичних взаємовідносин штамів *Fusarium moniliforme*, побудована за даними ПЛР-аналізу. *st13*, *st52*, *st55*, *st41*, *st53*, *st82*, *st122*, *st81* — номери досліджених штамів

Проте при подальшому збільшенні вибірки до 18 штамів *F. moniliforme* v. *lactis* використання тих самих восьми праймерів не виявило зазначеного згрупування штамів за рівнем патогенності. Дендрограма (рис. 3), що ілюструє генетичні дистанції в межах вибірки даного різновиду фузарієвих грибів, містить кластер, який складається з двох субкластерів: перший з непатогенними штамми *st13* і *st50/x*, слабкопатогенним — *st52*, а також із штамом помірної патогенності *st53*; в другий субкластер входять 13 штамів з різними показниками патогенності, що не асоціюють з показниками генетичних дистанцій.

У кластері відображена істотна внутрішньовидова мінливість. Рівень поліморфізму серед штамів кластера склав 49,4 %. У дослідженні ізолятів *Fusarium moniliforme* з різних регіонів Ulrik F. Schlacht і ін. [10] за допомогою RAPD-ПЛР рівень поліморфізму варіював від 3 до 53 %. Найбільш віддаленим від інших виявився штам *st82/5*, якому властивий дуже високий рівень патогенності. Таке саме явище спостерігалось при дослідженні вибірки з восьми штамів: *st81* є дуже високопатогенним і генетично найбільш віддаленим від інших штамів (рис. 2). Максимальне значення генетичної дистанції (0,492) серед 18 досліджених штамів виявлено для *st82/5* — штаму, що призводив до загибелі 100 % паростків, і *kl* — патогенного штаму; мінімальне (0,025) — для *kk* і *kl*, слабкопатогенного і патогенного відповідно.

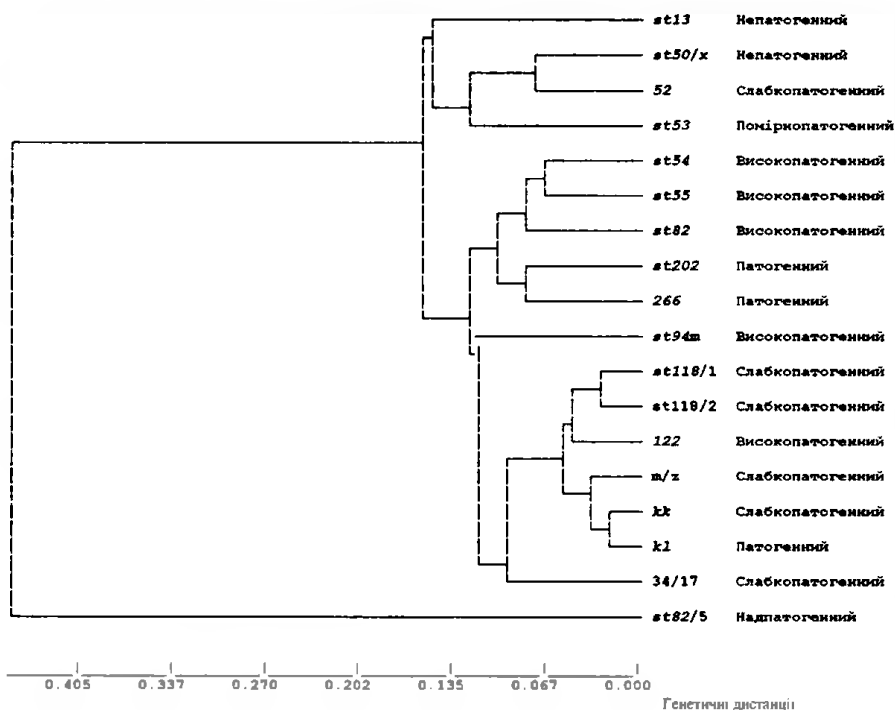


Рис. 3. Дендрограма феногенетичних взаємовідносин 18 штамів *Fusarium moniliforme*: st13, st50/x, st52, st55, st118/1, st118/2, 34/17, m/z, kk, st53, st202, st266, kl, st82, st54, st82/5, st94m, st122

Проведено аналогічні дослідження 18 штамів *F. gibbosum v. acuminatum*, але чіткого згрупування штамів за патогенністю не знайдено. Рівень поліморфізму склав 48 %. В результатах досліджень Ху R. і ін. [5] цей показник дорівнював 46 %, що пов'язано з меншим розміром вибірки (три ізоляти) за інших однакових умов.

Вивчення міжвидової і внутрішньовидової різноманітності за допомогою ISSR- і ДП-ПЛР дозволило встановити високий рівень поліморфізму як серед видів *Fusarium* (100 %), так і в межах вибірки одного виду (49 % для *F. moniliforme v. lactis* і 48 % для *F. gibbosum v. acuminatum*), що свідчить про широку мінливість досліджуваних об'єктів.

## Висновки

Рівень поліморфізму серед видів *Fusarium* — 100 %, в межах вибірки *F. moniliforme v. lactis* — 49 % і *F. gibbosum v. acuminatum* — 48 %, що свідчить про широку мінливість досліджуваного об'єкту. В цілому не відзначено відповідності між кластеризацією штамів за даними ДНК-профілювання і рівнем патогенності, хоч і спостерігається така тенденція при розгляді окремих кластерів.

## Література

1. Gelderblom W., Semple E., Marasas W. and Farber E. Cancer-initiating potential fumonisin B mycotoxins // Carcinogenesis. — 1992. — V. 13. — P. 433—437.
2. Снесивцева Н., Хмелевский Б. Санитария кормов. — М.: Колос, 1975. — 336 с.
3. Schiling A. G., Moller E. M., Geiger H. H. Polymerase chain-based assays for species — specific detection *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum* // Phytopathology. — 1996. — V. 86. — P. 515—522.
4. Szecsi, Moller E. Differentiation Hungarian isolates three *Fusarium* species from section *Liseola* RAPD analysis // Food Mycol. — 1998. — V. 1 № 4. — P. 219—227.
5. Xu R., Wolters P., Snijders C. RAPD fingerprinting six *Fusarium* species causing *Fusarium* blight in cereals and grasses // Proceedings International Symposium on wheat improvement for scab resistance. 5—11 May 2000. Suzhou and Nanjing, China. — P. 200—210.
6. Булат С., Мироненко Н. Идентификация грибов и анализ их генетической изменчивости методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными и неспецифичными праймерами // Генетика. — 1996. — Т. 32, № 2. — С. 165—183.
7. Булай В. И., Элланская И. А. Метод микрокультуры для получения типичного конидиеобразования у фузариев // Микология и фитопатология. — 1975. — Т. 9. — С. 74—76.
8. Moller E., Bahnweng G., Sandermann H. and Geiger H. Simple and efficient protocol for isolation high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Food Mycol. — 1998. — V. 1. — P. 6115—6116.
9. Календарь Р. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Доклады междунар. конф. "Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений". — Киев. — 1994. — С. 25—26.
10. Ulrike F. Schlacht, Evelyn M. Moller, and Hartwig G. Geiger Genetic diversity *Gibberella fujikuroi* isolates from different geographic origins / Proceedings fifth European *Fusarium* seminar. Szeged, Hungary, 29 August - 5 September. — 1997. — Vol. 25 № 3/1. — P. 557—560.

О. А. Деревянко<sup>1</sup>, Н. Э. Кожухова<sup>1</sup>, О. В. Бабаянц<sup>2</sup>, Ю. М. Сиволап<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОНУ, Овидиопольская дор. 3, Одесса, 65036, Украина

<sup>2</sup> Селекционно-генетический институт УААН, Овидиопольская дор. 3, Одесса, 65036, Украина

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *FUSARIUM SPP.* ЮЖНОГО РЕГИОНА УКРАИНЫ

### Резюме

Проведён ISSR- и ПП-ПЦР анализ меж- и внутривидового полиморфизма грибов рода *Fusarium*. Это исследование позволило установить высокий уровень молекулярно-генетического полиморфизма как среди видов *Fusarium* (100 %), так и внутри выборки вида (49 % для *F. moniliforme v. lactis* и 48 % для *F. gibbosum v. acuminatum*).

**Ключевые слова:** ПЦР-анализ, меж- и внутривидовой полиморфизм *F. moniliforme v. lactis*, *F. gibbosum v. acuminatum*.

**O. A. Derevyanko<sup>1</sup>, N. E. Kozhukhova<sup>1</sup>, O. V. Babayants<sup>2</sup>,  
Yu. M. Sivolap<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> South Plant Biotechnology Center UAAN,  
Ovidiopolskaya Dor. 3, Odessa, 65036 Ukraine

<sup>2</sup> Plant Breeding and Genetics Institute,  
Ovidiopolskaya Dor. 3, Odessa, 65036 Ukraine

**MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF *FUSARIUM SPP.*  
POPULATIONS OF THE SOUTH OF UKRAINE**

**Summary**

The ISSR- and AP-PCR analysis of inter- and intraspecific polymorphism of *Fusarium spp.* is carried out. This research allows to determine the high level of molecular-genetic polymorphism both in *Fusarium spp.* — 100 % and within species (49 % for *F. moniliforme v. lactis* and 48 % for *F. gibbosum v. acuminatum*).

**Keyword:** PCR-analysis, inter- and intraspecific polymorphism, *F. moniliforme v. lactis*, *F. gibbosum v. acuminatum*.