УДК 632.4.01/0.8:577.21.08

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *Rhizoctonia spp.*, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОКАЙМЛЕННУЮ ГЛАЗКОВУЮ ПЯТНИСТОСТЬ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР В БЕЛАРУСИ

Е.А. Волуевич, доктор биологических наук, В.И. Лукша, кандидат биологических наук
Институт генетики и цитологии
А.Г. Жуковский, кандидат с.-х. наук, В.Г. Лешкевич
Институт защиты растений

(Дата поступления статьи в редакцию 18.05.2015 г.)

В статье описывается метод выделения тотальной ДНК из мицелия Rhizoctonia spp. и методики ПЦР (полимеразной цепной реакции) – идентификации видов R. cerealis и R. solani с помощью подобранных видоспецифических молекулярных маркеров. Приведены примеры ПЦР – детекции этих видов грибов, представленных в коллекции изолятов, собранных в Беларуси сотрудниками Института защиты растений.

This paper describes a method for isolating of total DNA from Rhizoctonia spp. mycelium and PCR (polymerase chain reaction) techniques for the identification of R. cerealis and R. solani species using selected species-specific molecular markers. Here are the examples of PCR – detection of these fungi presented in the collection of isolates collected in Belarus by the Institute of Plant Protection.

Введение

Визуальная диагностика типов корневых и прикорневых гнилей зерновых культур сложная, так как заболевания корней и основания стебля вызывают разные патогены. Однако для своевременной и эффективной защиты растений необходимо располагать информацией по видовому составу возбудителей таких болезней. Это необходимо для определения целесообразности проведения защитных мероприятий и правильного подбора средств химической защиты растений.

Ризоктониоз (окаймленная глазковая пятнистость зерновых культур) вызывается двумя видами грибов – *R. solani* и *R. cerealis*. В Европе отмечено увеличение распространения окаймленной глазковой пятнистости, что обусловливает усиление значимости ризоктониоза и необходимость точной идентификации видов патогенов по каждому конкретному хозяйству, на каждом отдельном поле. Для точной идентификации возбудителей используют молекулярные методы, изложенные в данной статье.

Методы и объекты исследований

Для выделения ДНК из мицелия использовали изоляты *Rhizoctonia* spp., выращенные на твердой агаризованной среде в чашках Петри. Выделение изолятов изучаемых грибов из почвенных образцов проводили методом приманок. На 2-й день после полива почвы 5 деревянных березовых зубочисток помещали в пластиковые стаканчики объемом 200 мл вертикально в почву на глубину 5 см, равномерно размещая по поверхности. После 48 ч инкубации при комнатной температуре зубочистки удаляли из почвы и помещали в чашки Петри на картофельно-сахарозный агар (пять зубочисток на 1 чашку). Через 24 ч чашки просматривали под микроскопом с последующим отсевом культуры. Образцы почвы отбирали с полей, на которых произрастали озимые зерновые культуры.

Для выделения и очистки ДНК после растирания мицелия изолята в жидком азоте использовали стандартный набор «Genomic DNA Purification Kit» #K0512 (Thermo scientific EU). Процесс проводили согласно протоколу, предлагаемому производителем, с рядом собственных модификаций.

Амплификацию ДНК осуществляли на автоматическом программируемом термоциклере фирмы «PE Applied Biosystems» (США) (GenAmp System 2700). Для проведения ПЦР использовали BioTaqPolymerase и сопутствующие реактивы фирмы «DIALAT Ltd» (г. Москва) или TaqPolymerase производства ОДО «Праймтех» (г. Минск) с сопутствующими реактивами «DIALAT Ltd».

Для определения видовой принадлежности изолятов *Rizoctonia* spp. в коллекции Института защиты растений были использованы праймеры, синтезированные в ОДО «Праймтех».

Для идентификации изолятов вида *R. solani* использовали SCAR- маркер согласно Lemańczyk [1]: F/R: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/GMRS-(5'-AGTGGAACCAAGCATAACACT-3').

Для идентификации маркера ITS1/GMRS-3-550 применяли следующий протокол проведения ПЦР. Состав реакционной смеси объемом 20 мкл содержал: 50–70 нг ДНК; 1,5 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ dNTP; 0,2 мМ (400 нМ) каждого из пары праймеров; 1,25 ед. Taq – ДНК-полимеразы; буфер для ПЦР 10×; деионизированную воду в количестве, необходимом для доведения объема смеси до конечного. Программа ПЦР была следующей: денатурация 3 мин. при 94°С; далее 35 циклов по 1 мин. при 94°С; 1 мин. при 58,5°С и 2 мин. при 72°С; финальная элонгация в течение 5 мин. при температуре 72°С [1]. Принадлежность изолята к виду *R. solani* определяли по наличию маркерного фрагмента размером 550 п.н. при электрофорезе в агарозном геле.

Для идентификации вида *R. cerealis* использовали следующие ПЦР-маркеры: Rc2F/Rc2R(1)-800 и Rc2F/Rc2R(2)-800 [1, 2]. Эти маркеры представляют собой пары праймеров, составленные из одной и той же олигонуклеотидной последовательности в качестве прямого праймера: Rc2F (5'-AAAACTGGCAACCCTTGGTG-3') и двух вариантов обратных праймеров: Rc2R(1) (5'-TAACTCACCACTCCAGCC-3') [1] и Rc2R(2) (5'-TAACTCACCACTCCAGCCGTT-3') [2]. Обозначения в скобках (1) и (2) были введены нами для удобства работы. Принадлежность изолята к *R. cerealis* в случае использования маркеров Rc2F/Rc2R(1)-800 и Rc2F/Rc2R(2)-800 определяется по наличию диагностического фрагмента размером 800 п.н. при электрофорезе в агарозном геле.

Состав реакционной смеси для маркеров Rc2F/Rc2R(1)-800 и Rc2F/Rc2R(2)-800 объемом 20 мкл содержал: 50–70 нг ДНК; 2 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ dNTP; 0,4 мМ (400 нМ) каждого из пары праймеров; 1,25 ед. Taq-ДНК-полимеразы; буфер для ПЦР 10×; деионизированную воду в количестве, необходимом для доведения объема

смеси до конечного [1]. Программа ПЦР была следующей: денатурация 3 мин. при 94°С; далее 35 циклов по 1 мин. при 94°С; 1 мин. при 58,5°С и 2 мин. при 72°С; финальная элонгация в течение 5 мин. при температуре 72°С.

Размер ПЦР-продукта определяли на трансиллюминаторе при проходящем ультрафиолетовом свете после горизонтального электрофореза в 1 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Электрофорез осуществляли при комнатной температуре при параметрах тока 80V в течение 1 часа. Для приготовления агарозных гелей использовали агарозу TopVision™ производства «Fermentas». В каждую лунку вносили 10 мкл ПЦР-смеси и 1,5 мкл буфера (раствор в воде 0,25 % бромфенолового синего; 0,25 % ксилолцианола; 30 % глицерина). Для определения величины продуктов амплификации использовали маркер молекулярного веса «Сибэнзим» (Россия) 100–3000 п.н.

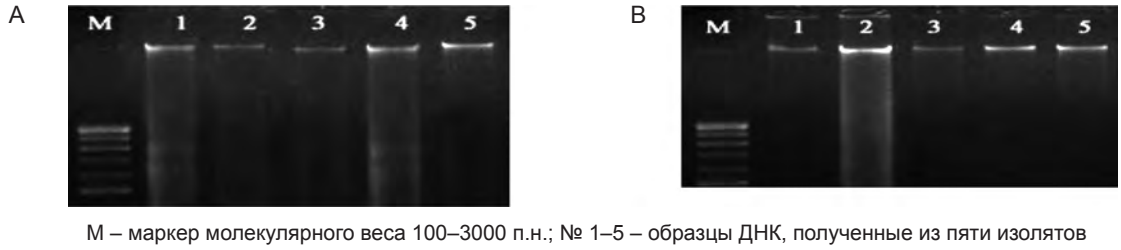
Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе исследований, заключавшемся в выделении и очистке образцов ДНК, вначале на выборке из пяти изолятов определили минимальное количество мицелия, необходимое для получения препаратов с достаточной для последующего анализа концентрацией ДНК. Сравнивали количество выхода ДНК при двух вариантах сбора исходного материала. Первый вариант – соскоб мицелия с поверхности агаризованной среды в чашках Петри, второй вариант – взятие материала из высечки агар-агара, содержащей мицелий. При использовании первого способа сбора материала оптимальным оказалось количество мицелия, взятого методом соскоба с поверхности среды в двух чашках Петри после пяти суток нарастания гриба. При втором способе – выделении ДНК гриба из высечки агар-агара с растущим мицелием – для гарантированного выделения ДНК оказалось достаточно мицелия, занимающего площадь 25–30 % в одной чашке Петри. Сравнение двух способов сбора исходного материала показало, что более предпочтительным является выделение ДНК из высечки агар-агара с гифами гриба. В данном случае выход ДНК оказался существенно выше.

Стандартная методика выделения ДНК была нами модифицирована. Так, для увеличения выхода ДНК время инкубации было увеличено с 5 мин., рекомендуемых разработчиком набора, до 40 мин. Нами было увеличено и время центрифугирования лизированного гомогената после добавления хлороформа с 2 мин. при 10000 об/мин. до 15 мин. при 12000 об/мин. Также после осаждения ДНК необходимо было увеличить время центрифугирования преципитата до 15 мин. Для осаждения ДНК использовали не этанол, как описано в стандартной методике, прилагаемой к набору, а изопропанол с добавлением 45 мкл 5 М раствора ацетата аммония. Содержимое каждой из пробирок мягко перемешивали, затем их переносили в морозильную камеру (–20 °С) на 18–24 ч (до утра следующего дня) для осаждения ДНК. Период замораживания можно исключить или сократить до 10–20 мин., однако выход ДНК при этом может существенно понизиться. Эта методика позволила получить ДНК изолятов в количестве и качестве очистки, удовлетворяющем проведение ПЦР с использованием видоспецифических маркеров.

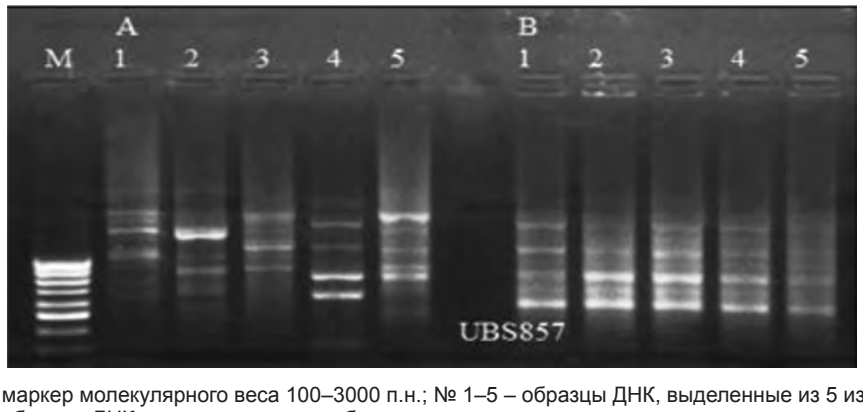
На рисунке 1А приведен пример результатов электрофореза ДНК, выделенной из пяти изолятов *Rizoctonia* spp., полученной из материала, взятого соскобом мицелия с поверхности среды в двух чашках Петри после пяти суток нарастания мицелия. Материал, полученный при выделении ДНК гриба из высечки агар-агара с растущим мицелием, занимающим площадь 25–30 % в одной чашке Петри, представлен на рисунке 1Б. Результаты свидетельствуют, что концентрация полученной ДНК гриба во втором случае, как правило, выше, чем в первом.

Чтобы оценить качество полученных препаратов ДНК, нами дополнительно была проведена проверка активности образцов ДНК при проведении ПЦР с использованием произвольного ISSR – маркера UBC 857. Оценка показа-



М – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; № 1–5 – образцы ДНК, полученные из пяти изолятов

Рисунок 1 – Результаты электрофореза образцов тотальной ДНК *Rizoctonia* spp., выделенных из мицелия 5 изолятов при сборе методом соскоба с поверхности среды в двух чашках Петри (А) и из высечек агар-агара с растущим мицелием, занимающим площадь 25 –30 % в одной чашке Петри (Б)



М – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; № 1–5 – образцы ДНК, выделенные из 5 изолятов;
А – образцы ДНК выделены при соскобе мицелия с поверхности агар-агара в двух чашках Петри;
Б – образцы ДНК получены из высечек агар-агара с растущим мицелием, занимающим площадь 25–30 % в одной чашке Петри

Рисунок 2 – Результаты разделения методом электрофореза продуктов амплификации ДНК изолятов *Rizoctonia* spp. с произвольным ISSR–маркером UBC 857 при двух способах сбора мицелия

ла, что в большинстве случаев выделенная из мицелия ДНК гриба обладает высокой реакционной способностью (рисунок 2).

Для определения видовой принадлежности изолятов *Rizoctonia* spp., представленных в коллекции Института защиты растений, был проведен ПЦР–анализ с видоспецифическими маркерами для выявления нуклеотидных последовательностей, характерных для *R. solani* (ITS1F/GMRS-3R) и *R. cerealis* (Rc2F/Rc2R) согласно Lemańczyk [1]. Пример амплификации с маркером ITS1F/GMRS-3R представлен на рисунке 3.

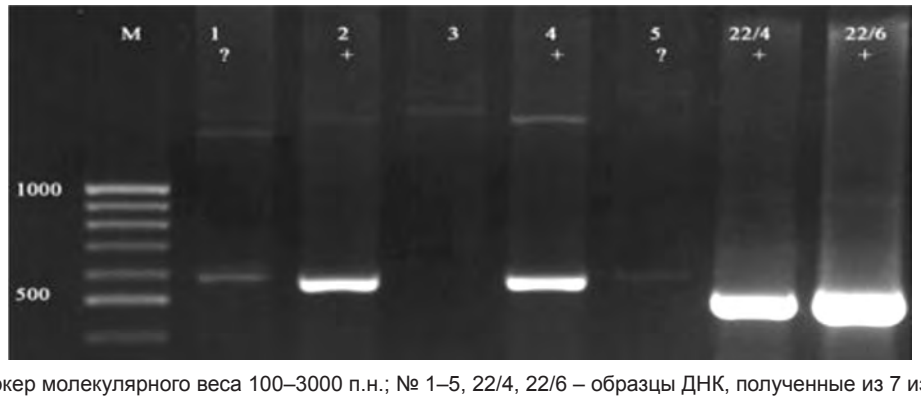
Наличие (+) фрагмента 550 п.н. характерно для *R. solani*. Этот фрагмент присутствует у изолятов № 2, 4, 22/4, 22/6. У изолятов № 1, 5 наблюдался слабо выраженный фрагмент.

Чтобы избежать ложных результатов из-за небольшого количества ПЦР-продукта, невидимого в агарозном геле, была проведена повторная амплификация с использованием ранее полученных ампликонов. Результаты повторной амплификации представлены на рисунке 4.

У большинства исследуемых образцов после повторной амплификации выявлен фрагмент 550 п.н., свидетельствующий о присутствии генетического материала *R. solani*.

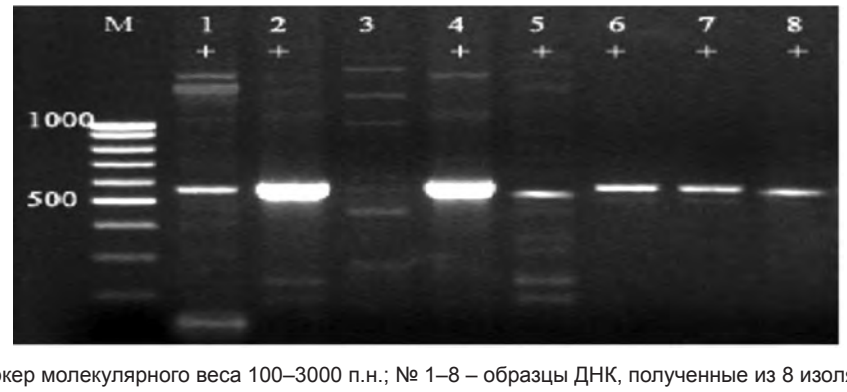
Для определения генетического материала *R. cerealis* был проведен ПЦР–анализ с маркером Rc2F/Rc2R(1). На рисунке 5 представлены результаты данной амплификации.

При использовании указанного маркера, как видно из рисунка 5, наряду с диагностическим фрагментом – молекулярным весом 800 п.н. (изолят № 22/6) присутствовали неспецифические фрагменты. Некоторые неспецифические фрагменты имели более высокую или сравнимую с диагностическим фрагментом концентрацию. Модификация условий проведения ПЦР с данной парой праймеров не позволила добиться существенного уменьшения образования неспецифических фрагментов, которые снижают возможность точной идентификации принадлежности изолятов к *R. cerealis*. Уменьшение в реакционной смеси концентрации некоторых компонентов и/или повышение



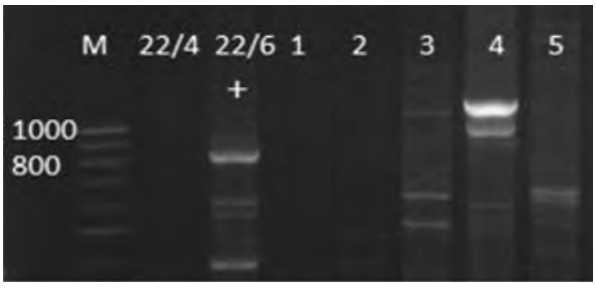
М – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; № 1–5, 22/4, 22/6 – образцы ДНК, полученные из 7 изолятов

Рисунок 3 – Пример результатов электрофореза продуктов амплификации ДНК изолятов *Rizoctonia* spp. с маркером ITS1F/GMRS-3R



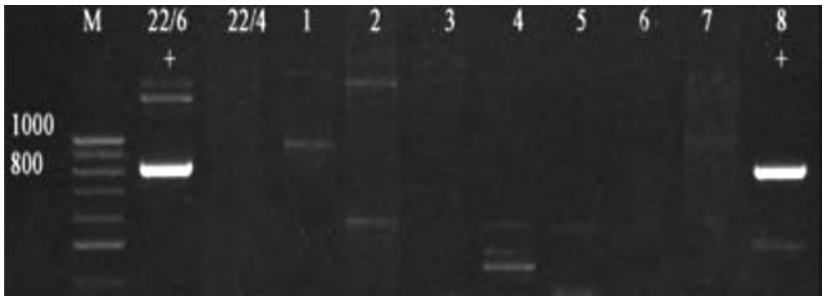
М – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; № 1–8 – образцы ДНК, полученные из 8 изолятов

Рисунок 4 – Пример результатов электрофореза продуктов амплификации ДНК изолятов *Rizoctonia* spp. с маркером ITS1F/GMRS-3R при повторной амплификации (наличие (+) фрагмента 550 п.н. характерно для *R.solani*)



М – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; № 22/4, 22/6, 1–5 – образцы ДНК, полученные из 7 изолятов

Рисунок 5 – Пример результатов электрофореза продуктов амплификации ДНК изолятов *Rizoctonia* spp. с маркером Rc2F/Rc2R(1) (наличие (+) фрагмента 800 п.н. характерно для *R. cerealis*)



M – маркер молекулярного веса 100–3000 п.н.; № 22/6, 22/4, 1–8 – образцы ДНК, полученные из 10 изолятов

Рисунок 6 – Пример результатов электрофореза продуктов амплификации ДНК изолятов *Rizoctonia* spp. с маркером Rc2F/Rc2(2)R-800 (наличие (+) фрагмента 800 п.н. характерно для *R. cerealis*; диагностический фрагмент 800 п.н. присутствует в изолятах № 22/6 и № 8)

температуры отжига праймеров приводило не столько к уменьшению количества амплифицируемых фрагментов, сколько к уменьшению выхода разноразмерных ПЦР-продуктов вплоть до отсутствия продуктов амплификации вообще, включая отсутствие ожидаемого маркерного фрагмента.

Nicholson и Parry предложили модификацию описанного выше маркера, заключающуюся в использовании в качестве обратного праймера сходную последовательность нуклеотидов, но с добавлением GTT на 3' конце, что, по их мнению, позволяло более точно идентифицировать генетический материал *R. cerealis* [2]. Использование такого модифицированного праймера, обозначенного нами как Rc2R(2), оказалось весьма эффективным. Применение маркера Rc2F/Rc2(2)R-800 позволило не только выявить генетический материал вида *R. cerealis* в коллекции изучаемых изолятов *Rizoctonia* spp., но и существенно снизить количество неспецифических фрагментов в продуктах амплификации (рисунок 6).

В целом, ПЦР-анализ представленных в коллекции Института защиты растений 55 изолятов *Rizoctonia* spp. показал, что 49 образцов ДНК имели высокую степень активности. У 6 изолятов отсутствие продуктов амплификации с видоспецифическими маркерами не позволило определить их принадлежность к изучаемым видам грибов. Причиной отсутствия ампликонов может являться низкое качество препаратов нативной ДНК, что было установлено при проведении ПЦР с произвольным ISSR-маркером UBC 857. Из 49 изолятов, для которых были проведены ПЦР-анализы с видоспецифическими маркерами, 41 образец представлен видом *R. solani*; 5 образцов (22/6, 8, 16, 29, 33) содержали ДНК как *R. solani*, так и *R. cerealis*. Три изолята (№ 3, 11, 12) не относились к выявляемым видам грибов.

Заключение

В результате постепенного увеличения в практике земледелия минимальной обработки почвы все в большей мере осознается экономическая значимость ризоктониоза как болезни, повреждающей корневую систему растений и основание стебля злаков, что приводит к неполной реализации их потенциала урожайности. В связи с этим существенное значение имеет правильная диагностика возбудителей болезней и определение средств и мероприятий по их защите. В коллекции изолятов *Rhizoctonia* spp., сформированной в Институте защиты растений, с помощью видоспецифических молекулярных маркеров доминировал вид *R. solani*. Вид *R. cerealis* был представлен совместно с *R. solani* только в пяти образцах. Структуру доминирования видов грибов, вызывающих ризоктониоз, необходимо учитывать при разработке мероприятий химической защиты зерновых культур в Беларуси.

Литература

1. Lemańczyk, G. Use of SCAR-PCR in diagnostics of stem base pathogens of the *Rhizoctonia* and *Oculimacula* genus /G. Lemańczyk // Acta agrobotanica. – 2011. – Vol. 64, № 4. – P. 197–206.
2. Nicholson, P. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat / P. Nicholson, D.W. Parry // Plant Pathol. – 1996. – Vol. 45. – P. 872–883.

Работа выполнена при финансовой поддержке АО «Сингента Агро Сервисез АГ»

УДК 631.348.4

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭФФЕКТИВНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ

А. Клочков, доктор технических наук,
П. Новицкий, кандидат технических наук
Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

(Дата поступления статьи в редакцию 03.05.2015 г.)

В системе химической защиты растений, которая представляется медициной в сельском хозяйстве, нет мелочей и второстепенных факторов. Для выполнения актуальной задачи по снижению пестицидной нагрузки и соответствующих затрат важно учитывать все условия химобработок и выполнять требования технологии. Только в этом случае можно добиться надежной защиты растений при минимальных дозах применяемых препаратов.

In crops chemical protection system, presented in agriculture, there are no secondary factors. It is important to take into consideration conditions of the chemical treatments and carry out technological requirements to achieve the aim on pesticide load reduction and related costs. Only in this case it is possible to get the crops reliable protection at minimal doses of the preparations application.