

Выделение и PBS-дифференциация изолятов *Alternaria spp.*

О. Н. Хапилина¹, А. С. Туржанова¹, О. Б. Райзер¹✉, Р. Н. Календарь¹

¹ Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Республика Казахстан

✉ E-mail: 2008olesya@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – выделение изолятов *Alternaria spp.* и их PBS-дифференциация. В статье представлены результаты по выделению фитопатогенных грибов рода *Alternaria spp.* из растений пшеницы и их генетической дифференциации с использованием iPBS (Inter Primer Binding Site Polymorphism) анализа. В результате мониторинговых исследований показано, что грибы *Alternaria spp.* являются доминантным компонентом патокомплекса грибов, поражающих зародышевую зону семян и колосья пшеницы в северных регионах Казахстана. Патоконкомплекс альтернариоза сформирован изолятами *A. alternata*, *A. infectoria* и *A. tenuissima*. **Методы.** Генетическую дифференциацию изолятов проводили с использованием iPBS-анализа. Метод основан на использовании консервативных последовательностей сайтов связывания тРНК (Primer Binding Sites) в качестве ПЦР праймеров. Данный метод является универсальным и эффективным для непосредственного выявления полиморфизма между индивидуумами, поэтому PBS-праймеры могут быть использованы практически у любых организмов, в том числе и у грибов. **Результаты.** Анализ PBS праймеров показал, что все они имеют высокую разрешающую способность при дифференциации изолятов *Alternaria spp.* Полученные продукты амплификации показали высокую вариабельность среди изолятов как внутри одного вида, так и на межвидовом уровне. Уровень детектируемого полиморфизма варьировал от 47,43 % до 80,81 %, в среднем этот показатель составил 61 %. Размер амплифицированных ПЦР-фрагментов был в диапазоне от 200 до 3000 п. н., в среднем наблюдали амплификацию от 5 до 15 бендов на каждый изолят. **Практическая значимость.** Данная работа позволила получить новые данные о генетическом разнообразии фитопатогенных грибов *Alternaria* для последующей разработки стратегии защиты растений от альтернариоза.

Ключевые слова: пшеница, изолят, *Alternaria spp.*, фитопатоген, альтернариоз, ПЦР, молекулярные маркеры, iPBS, амплификация.

Для цитирования: Хапилина О. Н., Туржанова А. С., Райзер О. Б., Календарь Р. Н. Выделение и PBS-дифференциация изолятов *Alternaria spp.* // Аграрный вестник Урала. 2020. № 10 (201). С. 64–72. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-201-10-64-72.

Дата поступления статьи: 02.09.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

Яровая пшеница в Казахстане является основной экспортной культурой и выращивается на площади примерно 14,3 млн га, из которых более 80 % сосредоточены в северном регионе [1]. Климатические условия Северного Казахстана являются благоприятными для выращивания большинства яровых зерновых культур, однако особенностью данного региона является нестабильность урожайности, что обусловлено не только агрометеорологическими факторами, но и воздействием вредных микроорганизмов.

Поражение пшеницы фитопатогенными грибами приводит к значительным потерям урожая, ухудшению его качества. Среди болезней пшеницы следует выделить альтернариоз, фузариоз и гельминтоспориоз, поскольку грибы, их вызывающие, заселяют поверхность зерна, проникают в зародышевую зону, а также поражают прикорневую зону стеблей пшеницы, что в последствие приводит к снижению качества и урожайности этой культуры. В последнее время наиболее часто из зародышевой зоны семян пшеницы выделяются микромицеты рода *Alternaria*, которые являются уже доминантным компонентом микробиома зерна [2, с. 11]. Виды этого рода широко распространены, встречаются как сапрофиты на растительных

остатках, а также как патогены различных видов растений [3, с. 93]. Некоторые виды являются возбудителями болезней агрономически и экономически важных растений, а также являются опасными послепосевными патогенами [4, с. 129], [5, с. 225]. Грибы *Alternaria* распространены на семенах злаковых культур, проникая внутрь семян, локализируются в эндосперме и плодовых оболочках, инфицируют зародыши, вызывая симптомы болезни «черный зародыш». Кроме того, могут снижать продуктивность растений, и ухудшать качество продуктов из зерна. Ухудшение качества зерна, вызванное способностью грибов рода *Alternaria* продуцировать микотоксины, в настоящее время активно исследуется, в ряде работ показано, что некоторые из метаболитов могут обладать канцерогенными и аллергенными свойствами [6, с. 181], [7, с. 1004].

Схожесть морфологических критериев и симптомов болезней у различных видов растений затрудняют видовую идентификацию рода *Alternaria* [8, с. 1], [9, с. 34]. В этой связи возникает необходимость использования разнообразных подходов (биохимических, молекулярно-генетических, морфологических) для выявления генетического полиморфизма и установления таксономической принадлежности [10, с. 123]. Популяции грибов этого рода

характеризуются значительным генетическим разнообразием, что связано со способностью конидий к миграции на большие расстояния, а также воздействием антропогенных факторов [11, с. 5].

Исследования генетического полиморфизма популяций и эволюционных взаимодействий проводят с использованием различных подходов, наиболее часто исследуют полиморфизм внутренних и межгенных транскрибируемых спейсеров (ITS, IGS) рибосомальной области ДНК [12, с. 62], [13, с. 1]. Для изучения аспектов таксономии и эволюционных взаимодействий этих фитопатогенных грибов используют различные ДНК-технологии, такие как RAPD, AFLP, ISSR и SSR, а также секвенируя ДНК- и белок-кодирующие регионы [9, с. 34], [14, с. 1], [15, с. 95]. В дополнение к этим маркерам изучение вариативности последовательностей ретротранспозонов может расширить знания о филогенетических взаимоотношениях внутри популяций фитопатогенных грибов.

Ретротранспозоны – потенциально мобильные элементы, распространены по всему геному, участвуют в мейотических рекомбинациях, вызывая его нестабильность вследствие инверсий и транслокаций [16, с. 1], [17, с. 483]. Как и в растительном геноме, активация ретротранспозонов способствует повышению генетической пластичности в ответ на экологический стресс, у грибов их активация способствует более быстрой эволюции [18, с. 53], [19, с. 1]. Несмотря на то что геном грибов значительно меньше в сравнении с растениями разработка молекулярных маркеров на основе ретротранспозонов затруднительна. Метод iPBS (Inter-Primer Binding Site Polymorphism), разработанный R. Kalendar с соавторами, позволяет преодолеть эту проблему, используя консервативные области последовательностей PBS (Primer Binding Site) сайтов ретротранспозонов как для выявления полиморфизма в профилях транскрипции, так и для поиска в базах данных ретротранспозонов [20, с. 1419]. Высококонсервативный PBS-регион характерен для различных семейств LTR ретротранспозонов [21, с. 233]. Данный метод является универсальным и эффективным для непосредственного выявления полиморфизма между индивидуумами, поэтому универсальные PBS-праймеры могут быть использованы практически у любых организмов, в том числе и у грибов [22, с. 128]. Несмотря на очевидные преимущества iPBS-метода, использование его для исследования генетического разнообразия грибов было очень ограниченным: только несколько видов *Alternaria* были исследованы, хотя зерно пшеницы может быть контаминировано несколькими видами одновременно [23, с. 479], [24, с. 225], [25, с. 307], [26, с. 76]. В данной работе мы использовали iPBS-метод для выявления генетического полиморфизма фитопатогенных грибов рода *Alternaria*, выделенных нами из зародышевой зоны семян пшеницы Казахстана.

Методология и методы исследования (Methods)

Выделение фитопатогенных грибов рода *Alternaria* проводили с использованием стандартных микробиологических методов, основанных на стимуляции роста и развития патогенов в лабораторных условиях [27, с. 20]. Долю конкретного вида (%) определяли, как отношение числа зерен, зараженных определенным видом к числу зерен, зараженных любыми видами этого рода.

Изоляты выращивали в чашках Петри на питательных средах при 25 °C в течение 7–15 дней. Микроскопический анализ грибов осуществляли на 7–15 сутки с использованием микроскопов Micros-200 (Austria) с фотонасадкой SSD, видеокамерой Hi-Resolution SD66P. Морфологические признаки изучаемых видов сравнивали со стандартными характеристиками из определительной литературы или с материалом, представленным на сайте <http://www.mycobank.org> [28, с. 28]. При этом учитывали такие признаки, как тип ветвления конидий, характеристика поверхности спор, их размер и др.

Выделение ДНК из фитопатогенных грибов проводили СТАВ-методом с собственными модификациями [29, с. 98], [30, с. 1]. Экстракцию геномной ДНК осуществляли из мицелия (50 мг) с использованием модифицированного экстракционного буфера СТАВ с РНКазой А (<http://primerdigital.com/dna>).

Генетическую идентификацию изолятов *Alternaria* spp. проводили методом ПЦР с использованием прямых праймеров ITS1 (5' ggaagtaaaagtcgtaacaagg 3') и ITS4 (5' tcctccgcttattgatatgc 3'). Температурно-временные параметры амплификации для праймеров включали предварительную денатурацию при 95 °C в течение 2 минут, затем 32 цикла: 95 °C – 10 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 60 с, 72 °C – 3 мин.

Генетическую изменчивость изолятов *Alternaria* spp. оценивали с использованием PBS-праймеров, разработанных R. Kalendar с соавторами [21, с. 233]. ПЦР-амплификацию проводили при следующих условиях: денатурация при 98 °C – 1 минута, затем 30 циклов в режиме 98 °C – 5 с, отжиг при 50–60 °C (в зависимости от праймера) – 20 с, элонгация при 72 °C – 60 с с последующей элонгацией при 72 °C – 3 мин. Каждую реакцию амплификации повторяли дважды на каждом образце ДНК.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом при 70 В в течение 6 ч в 1,5-процентном агарозном геле. Визуализацию продуктов амплификации проводили с использованием геледокументирующих систем ChemiDoc-It2 и PharosFX Plus с разрешением 50 мкм после окрашивания бромидом этидия. Анализ спектров амплификации проводили с использованием программного обеспечения GenAlex 6.5 [31, с. 2537].

Результаты (Results)

Исследования по выделению фитопатогенных грибов пшеницы были проведены в 2018–2019 гг. совместно с сотрудниками лаборатории микробиологии научно-производственного Центра зернового хозяйства им. А. И. Бараева. Были исследованы семена пшеницы различных сортов, районированных в Павлодарской, Актюбинской, Карагандинской, Акмолинской, Северо-Казахстанской областях. У всех обследованных образцов преобладала скрытая форма заражения зерновок (внешне здоровые, всхожие, имели нормальный блеск, налет гриба отсутствовал); но иногда наблюдалась и явная пораженность (формирование налета со спороношением гриба, разная степень деформации зерновок). Микологический анализ выявил присутствие в микобиоте различных видов грибов, относящихся к родам *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* и др. (рис. 1).



Рис. 1. Анализ семян пшеницы сорта Карагандинская 22 на наличие патогенной микрофлоры
Fig.1. Analysis of seeds of the wheat Karagandinskaya 22 for the pathogenic fungi

Сравнительный анализ родового состава показал, что наиболее часто зародышевая зона семян пшеницы была загрязнена грибами из рода *Alternaria*, выделяющихся с частотой до 50–77,5 %. Интенсивность поражения грибами из рода *Fusarium* была незначительной (3,7–10 %). Возбудитель гельминтоспориозной корневой гнили *Bipolaris* выделялся с частотой 3 %, данный патоген был идентифицирован только в пробах семян из Северо-Казахстанской области.

Также были проведены мониторинговые исследования на посевах пшеницы различных сортов в Акмолинской и Карагандинской областях в фазу молочно-восковой зрелости. В результате наблюдали интенсивное проявление сапрофитной инфекции, так называемой черни колоса, болезнь проявлялась на зрелых колосьях в виде черного налета. Сильное развитие черни колоса, наблюдаемое на посевах, мы связываем с продолжительной дождливой погодой в период налива зерна и, как следствие, поздней уборкой.

Микологический анализ стеблей, колосьев и колосковых чешуй, пораженных чернью, показал, что основными возбудителями, поражающими колосковые чешуи являлись грибы *Alternaria* spp. (рис. 2).

Анализ структуры возбудителей грибных болезней, загрязняющих растения пшеницы в период созревания зерна, выявил сдвиг преобладающих видов: существенную долю составляли грибы *Alternaria* sp. (до 75 %), также с высокой частотой выделялись представители рода *Fusarium* sp. (до 35 %). Частота выделения одного из вредоносных возбудителей корневой гнили *Bipolaris* sp. была незначительной – около 2 %. Также в низком количестве были представлены виды *Aspergillus* и *Penicillium*. Исследования выявили доминирующее положение в структуре грибных болезней пшеницы грибов рода *Alter-*

naria sp., этот факт побудил нас более детально подойти к их изучению.

Выделенные в чистую культуру изоляты *Alternaria* sp. культивировали на картофельно-декстрозном (PDA) и морковно-декстрозном (MDA) агаре для изучения морфолого-культуральных признаков с целью видовой идентификации.

Для возбудителей альтернариоза было характерно формирование цепочек конидий, отличающихся размерами, в легко распадающихся цепочках, разнообразной формы – грушевидных, обратнобуловидных, цилиндрических, яйцевидных. Цвет конидий – от бурых до темно оливковых, имеют 2–4 продольные и 1–2 поперечные перегородки. На основании изученных морфолого-культуральных признаков изоляты грибов *Alternaria* sp. были отнесены к видам *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* (рис. 3).

Для подтверждения видовой принадлежности дополнительно проводили молекулярно-генетическую идентификацию путем секвенирования последовательностей рибосомных генов, которые достаточно широко используются для идентификации филогенетического родства. Несмотря на высокую степень консервативности, не-транскрибирующиеся и транскрибирующиеся спейсерные последовательности ITS-регионов ДНК являются стабильным генетическим маркером, позволяющим надежно идентифицировать до вида эти фитопатогенные грибы.

Процент совпадений выделенных образцов *Alternaria* с последовательностями из GeneBank по числу совпадающих нуклеотидов был довольно высоким и составил 99–100 %.

Идентификация показала, что в выделившемся патокмлексе альтернариоза доминируют изоляты *A. alternata*, частота встречаемости которых составила 53,6 %, изоляты *A. infectoria* составили 34,1 %, изоляты *A. tenuissima* выделялись с частотой 12,3 %.

Для выявления генетического полиморфизма использовали только идентифицированные изоляты *Alternaria* с наиболее типичными морфолого-культуральными признаками, выделенными из различных регионов Казахстана. Всего для исследований было использовано 4 изолята *A. tenuissima*, 7 изолятов *A. infectoria* и 14 изолятов *A. alternata*.

Предварительно все PBS-праймеры были протестированы для определения их эффективности при детекции полиморфизма в ДНК фингерпринтинге у изолятов рода *Alternaria*. Эффективность оценивали по количеству амплифицированных фрагментов на 1 образец ДНК. В результате тестирования было выявлено, что только 4 праймера показали наивысшую эффективность в выявлении генетической дифференциации изолятов *Alternaria*, образуя множество одинаково интенсивных ампликонов. 6 праймеров образовывали от 2 до 4 ампликонов и 15 праймеров обладали средними показателями информативности. В результате тестирования iPBS праймеров для оценки генетического разнообразия изолятов *Alternaria*, были исключены праймеры, которые генерировали низкое количество продуктов ПЦР. Для дальнейших исследований были использованы праймеры с наивысшим баллом эффективности 2242, 2221 и 2237.



Рис. 2. Микологический анализ растений пшеницы с признаками черни колоса
Fig. 2. Mycological analysis of wheat plants with black head blight

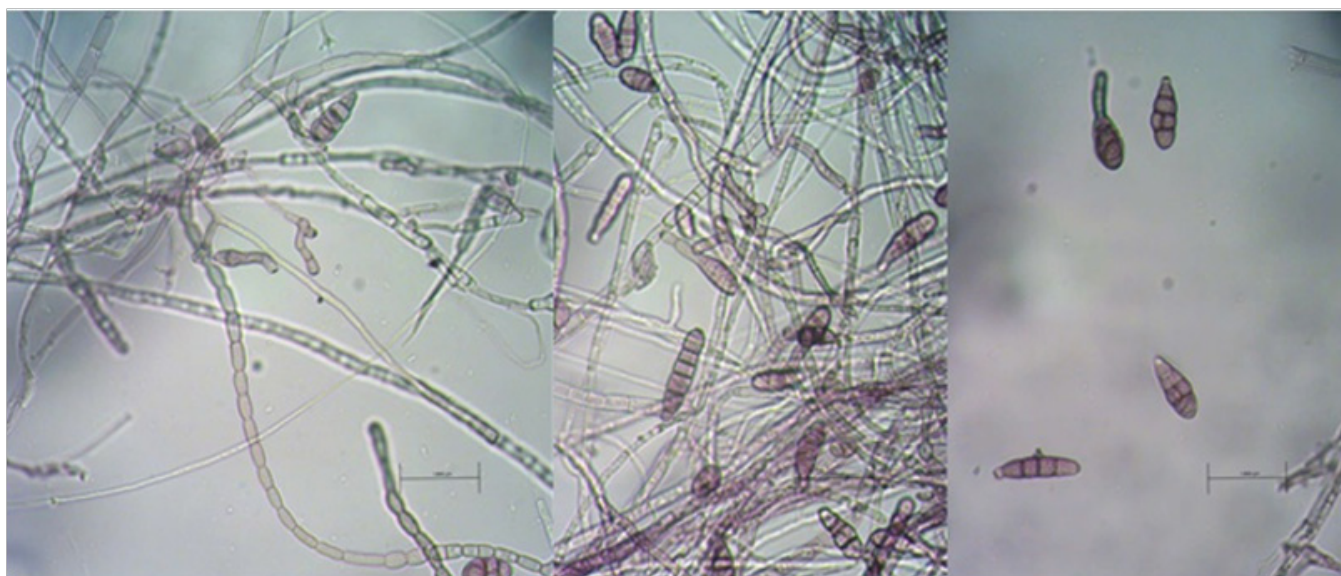


Рис. 3. Микроморфологические особенности грибов рода *Alternaria*, микроскоп Micros200, увеличение $\times 600$
Fig. 3. Micromorphological characteristics of *Alternaria* sp. Fungi, microscope Micros200, magnification $\times 600$

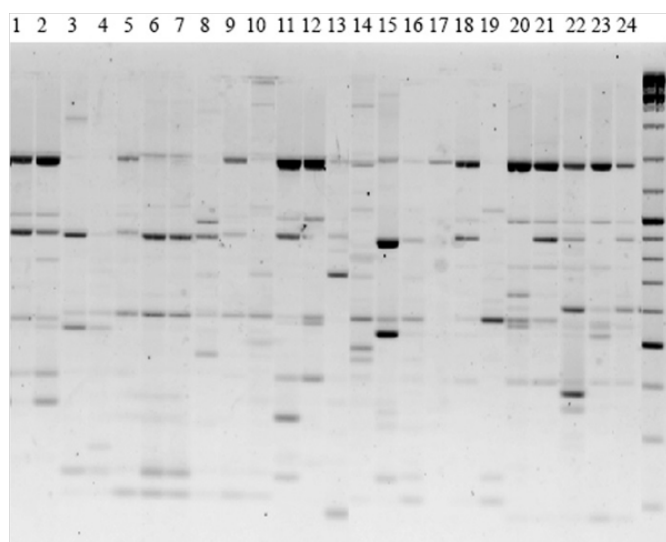


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК
изолатов *Alternaria* spp. с iPBS маркером 2237
Fig. 4. Electrophoretic analysis of PCR product from isolates *Alternaria* spp. with iPBS marker 2237

Полученные продукты амплификации показали высокую вариабельность среди изолятов, как внутри одного вида, так и на межвидовом уровне. Размер амплифицированных ПЦР-фрагментов был в диапазоне от 200 до 3000 п. н., в среднем наблюдали амплификацию 5–15 бендов на каждый изолят (рис. 4).

В результате амплификации с iPBS-праймерами (2221, 2237, 2242) было получено 328 фрагментов, 228 из которых были полиморфными. Анализ спектров амплификации показал варьирование уровня полиморфизма у различных видов *Alternaria* от 47 % до 80 %.

Результаты амплификации ДНК изолятов грибов, принадлежащих к различным видам *Alternaria*, с использованием iPBS-праймеров показали высокую эффективность данного метода. В результате чего данные праймеры были использованы для генетического анализа видов *Alternaria* (см. таблицу).

Таблица

Генетическое разнообразие видов *Alternaria* spp. по результатам iPBS фингерпринта

Вид	Количество штаммов	Аmplified fragments		Полиморфизм, %
		Всего	Полиморфных	
<i>A. alternata</i>	14	198	160	80,81
<i>A. infectoria</i>	6	78	37	47,43
<i>A. tenuissima</i>	4	52	31	59,63
Общее	24	328	228	61,01

Table

Genetic diversity of *Alternaria* spp. according to iPBS fingerprint

Species	Number of strains	Amplified fragments		Polymorphism, %
		Total	Polymorphic	
<i>A. alternata</i>	14	198	160	80.81
<i>A. infectoria</i>	6	78	37	47.43
<i>A. tenuissima</i>	4	52	31	59.63
Total	24	328	228	61.01

В среднем общий уровень детектируемого полиморфизма составил 61 %. Ранжирование штаммов, относящихся к различным видам *Alternaria* spp., по убыванию показателя PPL выглядит следующим образом *A. alternata* (80 %) > *A. tenuissima* (59 %) > *A. infectoria* (47 %).

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Грибные болезни растений, вызывающие значительное снижение урожайности, способны распространяться через семена. Вредоносность микроскопических грибов, контаминирующих семена сельскохозяйственных растений заключается не только в снижении всхожести и энергии прорастания, но и продуцировании микотоксинов, что представляют огромную опасность для млекопитающих. Грибы *Alternaria* являются доминантным компонентом микробиома зерна во многих регионах мира. Принимая во внимание значительную потенциальную опасность токсигенных видов *Alternaria*, проблеме изучения этих грибов в последнее время уделяется большое внимание. Следует отметить, что имеется недостаточно сведений о вреде и способах детекции микотоксинов, продуцируемых грибами рода *Alternaria*. Несмотря на относительно слабую токсичность метаболитов *A. tenuissima*, *A. alternata* для животных в сравнении с фузариотоксинами, вследствие высокой частоты встречаемости этих микромицетов их токсины могут быть опасны для человека, некоторые из них обладают канцерогенным эффектом [6, с. 181].

Грибы рода *Alternaria* отличаются значительной видовой вариабельностью морфолого-культуральных признаков, зачастую микроморфологические критерии могут сильно варьировать в пределах одного вида. Исследование генетического разнообразия этих патогенов, в том числе и с применением новейших молекулярно-генетических методов, позволит в дальнейшем разработать эффективные методы борьбы с альтернариозом не только на пшенице, но и на других сельскохозяйственных культурах. Оценку биоразнообразия проводят с использованием различных генетических маркеров, наиболее часто используют маркеры, не требующие значительных затрат в лаборатории. Некоторые исследования показывают низкую эффективность RAPD-маркеров вследствие низкой воспроизводимости [15, с. 95], [32, с. 9]. Использование микросателлитных

маркеров (SSR) лимитируется необходимостью дорогостоящего геномного секвенирования и биоинформационного анализа для поиска полиморфных SSR-локусов, с целью последующего подбора эффективных ПЦР пар праймеров [33, с. 53], [34, с. 1]. В данном случае эффективнее использовать маркеры, отличающиеся широким распределением в геноме и универсальностью для любого вида. К таким маркерам можно отнести повторяющиеся последовательности разнообразных классов ретротранспозонов. Ретротранспозоны имеют универсальный сайт праймирования tRNA (PBS), последовательности которого комплементарны минимум 12 нуклеотидам tRNA-последовательностей. Это является достаточным для применения их в качестве ПЦР-праймеров с последующей детекцией полиморфизма в агарозном геле [21, с. 233], [35, с. 453]. Данный метод позволяет анализировать полиморфизм ретротранспозонов любого организма без предварительного изучения последовательностей.

Данный метод был успешно применен для исследования полиморфизма грибов [25, с. 307], [26, с. 76], [27, с. 20]. Проведенные нами исследования показали высокий уровень информативности используемых праймеров. Количество амплифицированных фрагментов было достаточным для проведения идентификации генетического полиморфизма, уровень которого был высоким и варьировал от 47,43 % до 80,81 %. Количество генерированных бендов (как общих, так и полиморфных) было высоким и сопоставимо с аналогичными результатами у других исследователей [25, с. 307], [36, с. 28], [37, с. 142]. Используемые нами праймеры (2221, 2237, 2242) с высоким уровнем насыщения спектров амплификации позволили разделить выделенные генотипы, в соответствии с их таксономической классификацией. Это указывает на возможность в дальнейшем использовать данный метод для разработки системы идентификации сложного фитопатогенного вида *Alternaria*. Наши результаты подтверждают, что iPBS-анализ является мощным и полезным инструментом для анализа внутривидовой изменчивости этих грибов.

Благодарности (Acknowledgements)

Работа выполнена в рамках проекта АР 05130404.

Библиографический список

1. Agency for statistics of RK [Электронный ресурс]. URL: <http://stat.gov.kz> (дата обращения: 03.08.2020).
2. Ганнибал Ф. Б. Альтерналиоз зерна – современный взгляд на проблему // Защита и карантин растений. 2014. № 6. С. 11–15.
3. Lee H. B., Patriarca A., Magan N. Alternaria in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology // Mycobiology. 2015. Vol. 43. No. 2. Pp. 93–106. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.2.93.
4. Gannibal P., Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin and occurrence // World Mycotoxin Journal. 2009. Vol. 2. Pp. 129–140.
5. Thomma B. P. H. J., Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite // Molecular Plant Pathology. 2003. Vol. 4. No. 4. Pp. 225–236.
6. Huybrechts I., De Ruyck K., De Saeger S., De Boevre M. Uniting large-scale databases to unravel the impact of chronic multi-mycotoxins exposures on colorectal cancer incidence in Europe // China Agricultural Science and Technology Press: proceedings of the 2nd MycoKey International Conference. Wuhan, 2018. Pp. 181–183.
7. Castañares E., Pavicich M. A., Dinolfo M. I., Moreyra F., Stenglein S. A., Natural occurrence of Alternaria mycotoxins in malting barley grains in the main producing region of Argentina // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019. Vol. 100. Pp. 1004–1011. DOI: 10.1002/jsfa.10101.
8. Lawrence D., Rotondo F., Gannibal F. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus Alternaria // Mycological Progress. 2016. Vol. 15. Pp. 1–22. DOI: 10.1007/s11557-015-1144-x.
9. Somma S., Amatulli M. T., Masiello M., Logrieco A. Alternaria species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach // International Journal of Food Microbiology. 2019. Vol. 293. Pp. 34–43.
10. Pavón M. Á., López-Calleja I. M., González I., Martín R., García T. Targeting Conserved Genes in Alternaria Species // Mycotoxigenic Fungi. 2017. Vol. 1542. Pp. 123–129.
11. Levitin M., Gulyaeva E., Gagkaeva T., Gannibal P. Population studies of fungi causing the diseases of grain crops // Plant Protection News. 2019. Vol. 4. No. 102. Pp. 5–16. DOI: 10.31993/2308-6459-2019-4-102-5-16.
12. Woudenberg J., Merwe N., Jurjević Ž., Groenewald J., Crous P. Diversity and movement of indoor Alternaria alternata across the mainland USA // Fungal Genetics and Biology. 2015. Vol. 81. Pp. 62–72. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.05.003.
13. Badotti F., de Oliveira F., Garcia C., Vaz A., Fonseca P., Nahum L., Góes-Neto A. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi) // BMC Microbiology. 2017. Vol. 17 (1). DOI: 10.1186/s12866-017-0958-x.
14. Andersen B., Nielsen K., Fernández Pinto V., Patriarca A. Characterization of Alternaria strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat // International Journal of Food Microbiology. 2015. Vol. 196. Pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.029.
15. Andrew M., Peever T., Pryor B. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored Alternaria species complex // Mycologia. 2009. Vol. 101. No. 1. Pp. 95–109. DOI: 10.3852/08-135.
16. Sun S., Yadav V., Billmyre R., Cuomo C., Nowrousian M., Wang L., Fungal genome and mating system transitions facilitated by chromosomal translocations involving intercentromeric recombination // PLoS Biology. 2017. Vol. 15 (8). DOI: 10.1371/journal.pbio.2002527.
17. Mehrabi R., Mirzadi Gohari A., Kema G. Karyotype Variability in Plant-Pathogenic Fungi // Annual Review of Phytopathology. 2017. Vol. 55. No. 1. Pp. 483–503. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-095928.
18. Ohama N., Sato H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response // Trends in Plant Science. 2017. Vol. 22. No. 1. Pp. 53–65. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.015.
19. Fouché S., Badet T., Oggenfuss U., Plissonneau C., Francisco C. S. Croll D. Stress-driven transposable element de-repression dynamics in a fungal pathogen // bioRxiv. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/633693>.
20. Kalendar R., Antonius K., et al. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // Theoretical and Applied Genetics. 2010. Vol. 121. No. 8. Pp. 1419–1430. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
21. Kalendar R., Schulman A. H. Transposon-Based Tagging: IRAP, REMAP, and iPBS // Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Totowa, New Jersey: Humana Press, 2014. Vol. 1115. Pp. 233–255. DOI: 10.1007/978-1-62703-767-9_12.
22. Kalendar R. N., Aizharkyn K. S., Khapilina O. N., Amenov A. A., Tagimanova D. S. Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017. Vol. 21 (1). Pp. 128–134. DOI: 10.18699/VJ17.231.
23. Borna F., Luo S., Ahmad N., Nazeri V., Shokrpour M., Trethowan R. Genetic diversity in populations of the medicinal plant Leonurus cardiaca L. revealed by inter-primer binding site (iPBS) markers // Genetic Resources and Crop Evolution. 2016. Vol. 64. Pp. 479–492. DOI: 10.1007/s10722-016-0373-4.
24. Ozer G., Bayraktar H. Genetic diversity of Fusarium oxysporum f. sp. cumini isolates analyzed by vegetative compatibility, sequences analysis of the rDNA IGS region and iPBS retrotransposon markers // Journal of Plant Pathology. 2018. Vol. 100. Pp. 225–232. DOI: 10.1007/s42161-018-0063-5.
25. Šķipars V., Siaredzich M., Belevich V., Bruņeviča N., Brūna L., Ruņģis D. Genetic differentiation of Phoma sp. isolates using retrotransposon-based iPBS assays // Environmental and Experimental Biology. 2018. Vol. 16. Pp. 307–314. DOI: 10.22364/eeb.16.22.

26. Wu J., Xie X., Shi Y., Chai A., Wang Q., Li B. Analysis of pathogenic and genetic variability of *Corynespora cassiicola* based on iPBS retrotransposons // Canadian Journal of Plant Pathology. 2019. Vol. 41. Pp. 76–86. DOI: 10.1080/07060661.2018.1516239.
27. Барбарош В. Фитопатологическая экспертиза семян // Защита и карантин растений. 2004. № 2. С. 20–21.
28. Ганнибал Ф. Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*: методическое пособие. Санкт-Петербург, 2011. 72 с.
29. Пат. 32271 Республика Казахстан, МПК C12M 15/00 (2006.01), C07H 21/04 (2006.01). Способ экстракции геномной ДНК, обогащенной последовательностями генов / Р. Н. Календарь, О. Н. Хапилина, А. А. Аменов, Д. С. Тагиманова; РГП «Национальный центр биотехнологии»; заявл. 5.01.2016; опубл. 31.07.2017, Бюл. № 14. С. 98.
30. Turzhanova A., Rukavitsyna I., Khapilina O., Kalendar R. Optimization of DNA extraction from filamentous fungi *Alternaria* sp. and *Fusarium* sp. // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 2018. Vol. 3. Pp. 1–9. DOI: 10.11134/btp.3.2018.4.
31. Peakall R., Smouse P. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // Bioinformatics. 2012. Vol. 28. Pp. 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
32. Khosa J., McCallum J., Dhatt A., Macknight R. Enhancing onion breeding using molecular tools // Plant Breeding. 2015. Vol. 135. Pp. 9–20. DOI: 10.1111/pbr.12330.
33. Guo L., Xu L., Zheng W., Hyde K. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS) // Fungal Diversity. 2004. Vol. 16. Pp. 53–65.
34. Yang N., Ma G., Chen K., Wu X. The Population Genetics of *Alternaria tenuissima* in Four Regions of China as Determined by Microsatellite Markers Obtained by Transcriptome Sequencing // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. Pp. 1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02904.
35. Andeden E., Baloch F., Derya M. iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual *Cicer* species // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2013. Vol. 22. Pp. 453–466. DOI: 10.1007/s13562-012-0175-5.
36. Bayraktar H., Dolar F. Molecular Identification and Genetic Diversity of *Fusarium* species Associated with Onion Fields in Turkey // Journal of Phytopathology. 2010. Vol. 159 (1). Pp. 28–34. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01715.x.
37. Özer G., Bayraktar H., Baloch F. iPBS retrotransposons “A Universal Retrotransposons” now in molecular phylogeny of fungal pathogens // Biochemical Systematics and Ecology. 2016. Vol. 68. Pp. 142–147. DOI: 10.1016/j.bse.2016.07.006.

Об авторах:

Оксана Николаевна Хапилина¹, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений и биоинформатики, ORCID 0000-0002-7256-568, AuthorID 57194829297; +7 705 749-14-75, oksfur@mail.ru
 Айнура Сериковна Туржанова¹, магистр технических наук, научный сотрудник лаборатории геномики растений и биоинформатики, ORCID 0000-0001-6205-9292, AuthorID 57216895766; +7 775-536-95-42, turzhanova-ainur@mail.ru
 Олеся Борисовна Райзер¹, магистр сельскохозяйственных наук, научный сотрудник лаборатории геномики растений и биоинформатики, ORCID 0000-0003-0754-3342, AuthorID 57216895212; +7 777 880-12-02, 2008olesya@mail.ru
 Руслан Николаевич Календарь¹, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией геномики растений и биоинформатики, ORCID 0000-0003-3986-2460, AuthorID 6602789279; +7 705 114-88-85, ruslan.kalendar@mail.ru

¹ Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Республика Казахстан

Isolation and PBS differentiation of isolates *Alternaria* spp.

O. N. Khapilina¹, A. S. Turzhanova¹, O. B. Raizer[✉], R. N. Kalendar¹

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

✉ E-mail: 2008olesya@mail.ru

Abstract. The purpose of the study. Isolation of *Alternaria* sp. and their PBS differentiation. The article presents the results of isolation of phytopathogenic fungi of the genus *Alternaria* spp. from wheat plants and their genetic differentiation using iPBS (Inter Primer Binding Site Polymorphism) analysis. As a result of monitoring studies, it was shown that the fungi *Alternaria* spp. are the dominant component of the pathocomplex of fungi affecting the embryonic zone of seeds and ears of wheat in the northern regions of Kazakhstan. The pathocomplex of *Alternaria* is formed by isolates of *A. alternata*, *A. infectoria*, and *A. tenuissima*. **Methods.** Genetic differentiation of the isolates was performed using iPBS analysis. This method is based on the use of conserved sequences of tRNA binding sites (Primer Binding Sites) as PCR primers. This method is versatile and effective for the direct detection of polymorphism between individuals; therefore, PBS primers can be used in almost any organism, including fungi. **Results.** Analysis of the PBS primers showed that they all have high resolution in the differentiation of *Alternaria* spp. The obtained amplification products showed high variability among isolates, both within one species and at the inter-species level. The level of detectable polymorphism varied from 47.43 % to 80.81 %, with an average of 61 %. The size of the amplified PCR fragments ranged from 200 to 3000 bp; on average, amplification was observed from 5 to 15 bands per isolate. **Practical significance.** This work made it possible to obtain new data on the genetic diversity of *Alternaria* phytopathogenic fungi for the subsequent development of a strategy for plant protection against *Alternaria*.

Keywords: wheat, isolate, *Alternaria* sp., phytopathogen, alternarioz, PCR, molecular markers, iPBS, amplification.

For citation: Khapilina O. N., Turzhanova A. S., Rayzer O. B., Kalendar R. N. Vydelenie i PBS-differentsiatsiya izolyatov *Alternaria spp.* [Isolation and PBS differentiation of isolates *Alternaria spp.*] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 10 (201). Pp. 64–72. DOI:10.32417/1997-4868-2020-201-10-64-72. (In Russian.)

Paper submitted: 02.09.2020.

References

1. Agency for statistics of RK [e-resource]. URL: <http://stat.gov.kz> (appeal date: 03.08.2020).
2. Gannibal F. B. Al'ternarioz zerna – sovremennyy vzglyad na problem [Alternaria grain disease – a modern view of the problem] // Zashchita i karantin rasteniy. 2014. No. 6. Pp. 11–15. (In Russian.)
3. Lee H. B., Patriarca A., Magan N. Alternaria in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology // Mycobiology. 2015. Vol. 43. No. 2. Pp. 93–106. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.2.93.
4. Gannibal P., Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin and occurrence // World Mycotoxin Journal. 2009. Vol. 2. Pp. 129–140.
5. Thomma B. P. H. J., Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite // Molecular Plant Pathology. 2003. Vol. 4. No. 4. Pp. 225–236.
6. Huybrechts I., De Ruyck K., De Saeger S., De Boevre M. Uniting large-scale databases to unravel the impact of chronic multi-mycotoxins exposures on colorectal cancer incidence in Europe // China Agricultural Science and Technology Press: proceedings of the 2nd MycoKey International Conference. Wuhan, 2018. Pp. 181–183.
7. Castañares E., Pavicich M. A., Dinolfo M. I., Moreyra F., Stenglein S. A., Natural occurrence of Alternaria mycotoxins in malting barley grains in the main producing region of Argentina // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019. Vol. 100. Pp. 1004–1011. DOI: 10.1002/jsfa.10101.
8. Lawrence D., Rotondo F., Gannibal F. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus Alternaria // Mycological Progress. 2016. Vol. 15. Pp. 1–22. DOI: 10.1007/s11557-015-1144-x.
9. Somma S., Amatulli M. T., Masiello M., Logrieco A. Alternaria species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach // International Journal of Food Microbiology. 2019. Vol. 293. Pp. 34–43.
10. Pavón M. Á., López-Calleja I. M., González I., Martín R., García T. Targeting Conserved Genes in Alternaria Species // Mycotoxigenic Fungi. 2017. Vol. 1542. Pp. 123–129.
11. Levitin M., Gulyaeva E., Gagkaeva T., Gannibal P. Population studies of fungi causing the diseases of grain crops // Plant Protection News. 2019. Vol. 4. No. 102. Pp. 5–16. DOI: 10.31993/2308-6459-2019-4-102-5-16.
12. Woudenberg J., Merwe N., Jurjević Ž., Groenewald J., Crous P. Diversity and movement of indoor Alternaria alternata across the mainland USA // Fungal Genetics and Biology. 2015. Vol. 81. Pp. 62–72. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.05.003.
13. Badotti F., de Oliveira F., Garcia C., Vaz A., Fonseca P., Nahum L., Góes-Neto A. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi) // BMC Microbiology. 2017. Vol. 17 (1). DOI: 10.1186/s12866-017-0958-x.
14. Andersen B., Nielsen K., Fernández Pinto V., Patriarca A. Characterization of Alternaria strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat // International Journal of Food Microbiology. 2015. Vol. 196. Pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.029.
15. Andrew M., Peever T., Pryor B. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored Alternaria species complex // Mycologia. 2009. Vol. 101. No. 1. Pp. 95–109. DOI: 10.3852/08-135.
16. Sun S., Yadav V., Billmyre R., Cuomo C., Nowrousian M., Wang L., Fungal genome and mating system transitions facilitated by chromosomal translocations involving intercentromeric recombination // PLoS Biology. 2017. Vol. 15 (8). DOI: 10.1371/journal.pbio.2002527.
17. Mehrabi R., Mirzadi Gohari A., Kema G. Karyotype Variability in Plant-Pathogenic Fungi // Annual Review of Phytopathology. 2017. Vol. 55. No. 1. Pp. 483–503. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-095928.
18. Ohama N., Sato H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response // Trends in Plant Science. 2017. Vol. 22. No. 1. Pp. 53–65. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.015.
19. Fouché S., Badet T., Oggenfuss U., Plissonneau C., Francisco C. S. Croll D. Stress-driven transposable element de-repression dynamics in a fungal pathogen // bioRxiv. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/633693>.
20. Kalendar R., Antonius K., et al. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // Theoretical and Applied Genetics. 2010. Vol. 121. No. 8. Pp. 1419–1430. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
21. Kalendar R., Schulman A.H. Transposon-Based Tagging: IRAP, REMAP, and iPBS // Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Totowa, New Jersey: Humana Press, 2014. Vol. 1115. Pp. 233–255. DOI: 10.1007/978-1-62703-767-9_12.
22. Kalendar R. N., Aizharkyn K. S., Khapilina O. N., Amenov A. A., Tagimanova D. S. Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017. Vol. 21 (1). Pp. 128–134. DOI: 10.18699/VJ17.231.
23. Borna F., Luo S., Ahmad N., Nazeri V., Shokrpour M., Trethowan R. Genetic diversity in populations of the medicinal plant Leonurus cardiaca L. revealed by inter-primer binding site (iPBS) markers // Genetic Resources and Crop Evolution. 2016. Vol. 64. Pp. 479–492. DOI: 10.1007/s10722-016-0373-4.

24. Ozer G., Bayraktar H. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* isolates analyzed by vegetative compatibility, sequences analysis of the rDNA IGS region and iPBS retrotransposon markers // *Journal of Plant Pathology*. 2018. Vol. 100. Pp. 225–232. DOI: 10.1007/s42161-018-0063-5.
25. Škipars V., Siaredzich M., Belevich V., Bruņeviča N., Brūna L., Ruņģis D. Genetic differentiation of *Phoma* sp. isolates using retrotransposon-based iPBS assays // *Environmental and Experimental Biology*. 2018. Vol. 16. Pp. 307–314. DOI: 10.22364/eeb.16.22.
26. Wu J., Xie X., Shi Y., Chai A., Wang Q., Li B. Analysis of pathogenic and genetic variability of *Corynespora cassicola* based on iPBS retrotransposons // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2019. Vol. 41. Pp. 76–86. DOI: 10.1080/07060661.2018.1516239.
27. Barbarosh V. Fitopatologicheskaya ekspertiza semyan [Phytopathological examination of seeds] // *Zashchita i karantin rasteniy*. 2004. No. 2. Pp. 20–21. (In Russian.)
28. Gannibal F. B. Monitoring al'ternariozov sel'skokhozyaystvennykh kul'tur i identifikatsiya gribov roda *Alternaria*: metodicheskoe posobie [*Alternaria* monitoring of agricultural crops and identification of fungi of the genus *Alternaria*: a methodological guide]. St. Petersburg, 2011. 72 p. (In Russian.)
29. Pat. 32271 The Republic of Kazakhstan, MPK C12M 15/00 (2006.01), C07H 21/04 (2006.01). Sposob ekstraksii genomnoy DNK, obogashchennoy posledovatel'styami [Method for the extraction of sequence-enriched genomic DNA] / R. N. Kalendar, O. N. Khapilina, A. A. Amenov, D. S. Tagimanova; RSE "National Center for Biotechnology"; declared 01.05.2016; publ. 07.31.2017. Bull. No. 14. 98 p. (In Russian.)
30. Turzhanova A., Rukavitsyna I., Khapilina O., Kalendar R. Optimization of DNA extraction from filamentous fungi *Alternaria* sp. and *Fusarium* sp. // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2018. Vol. 3. Pp. 1–9. DOI: 10.11134/btp.3.2018.4.
31. Peakall R., Smouse P. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. Pp. 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
32. Khosa J., McCallum J., Dhatt A., Macknight R. Enhancing onion breeding using molecular tools // *Plant Breeding*. 2015. Vol. 135. Pp. 9–20. DOI: 10.1111/pbr.12330.
33. Guo L., Xu L., Zheng W., Hyde K. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS) // *Fungal Diversity*. 2004. Vol. 16. Pp. 53–65.
34. Yang N., Ma G., Chen K., Wu X. The Population Genetics of *Alternaria tenuissima* in Four Regions of China as Determined by Microsatellite Markers Obtained by Transcriptome Sequencing // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. Pp. 1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02904.
35. Andeden E., Baloch F., Derya M. iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual *Cicer* species // *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2013. Vol. 22. Pp. 453–466. DOI: 10.1007/s13562-012-0175-5.
36. Bayraktar H., Dolar F. Molecular Identification and Genetic Diversity of *Fusarium* species Associated with Onion Fields in Turkey // *Journal of Phytopathology*. 2010. Vol. 159 (1). Pp. 28–34. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01715.x.
37. Özer G., Bayraktar H., Baloch F. iPBS retrotransposons "A Universal Retrotransposons" now in molecular phylogeny of fungal pathogens // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2016. Vol. 68. Pp. 142–147. DOI: 10.1016/j.bse.2016.07.006.

Authors' information:

Oksana N. Khapilina¹, candidate of biological sciences, leading researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0002-7256-568, AuthorID 57194829297; +7 705 749-14-75, oksfur@mail.ru

Ainur S. Turzhanova¹, master of engineering science, researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0001-6205-9292, AuthorID 57216895766; +7 775-536-95-42, turzhanova-ainur@mail.ru

Olesya B. Raizer¹, master of agricultural sciences, researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0003-0754-3342, AuthorID 57216895212; +7 777 880-12-02, 2008olesya@mail.ru

Ruslan N. Kalendar¹, candidate of biological sciences, associate professor, head of the laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0003-3986-2460, AuthorID 6602789279; +7 705 114-88-85, ruslan.kalendar@mail.ru

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan