

АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *ASPERGILLUS FLAVUS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Н.Феоктистова ^{*}, Е.Сульдина , А. Мاستиленко , А. Ломакин 

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,
г. Ульяновск, Российская Федерация
feokna@yandex.ru

Аннотация: в статье представлены результаты исследований по апробации тест-системы для индикации и идентификации микроскопических грибов *Aspergillus flavus* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени». Применяя программное обеспечение Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0. Тест-система для *A. flavus* включает специфические праймеры: прямой праймер (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратный праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA; флуоресцентный краситель: HEX, зонд - CGGTTTCGCTTTGGTCATCGT, гаситель BHQ2. Протокол постановки реакции: предварительная денатурация – 95°C - 5 минут (1 цикл); денатурация - 95°C - 5 сек, отжиг - 60°C - 15 сек (50 циклов). Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентный краситель – ROX, гаситель - BHQ-2. Чувствительность тест-системы составляет 1000 клеток. Установлена оптимальная концентрация праймеров равная 9 pM каждого праймера на реакцию. Оптимальная концентрация зонда - 0,4 pM. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение дихотомических ключей не позволяет максимально точно дифференцировать фитопатогенные грибы *A. flavus*. Новый подход к идентификации изолятов подтвердил принадлежность 15 выделенных штаммов к виду *A. flavus* из 20 выделенных из проб кукурузы с признаками, проявляющимися, как загнивание корней и увядание, и первично типированных как *Aspergillus* на основании изучения культурально-морфологических свойств. Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200367-8.

Ключевые слова: *Aspergillus flavus*; тест-система; полимеразная цепная реакция; идентификация; кукуруза; индикация

№12
2022

Введение

В настоящее время проблема контаминации сельскохозяйственных растений (вегетативных форм и зерна) приобретает определенное хозяйственное значение. *A. flavus* является условно-патогенным микроорганизмом сельскохозяйственных культур, особенно масличных, таких как кукуруза, арахис и семена хлопка. *A. flavus* присутствует в почве в виде конидий или склероций и в тканях растений в виде мицелия. Его штаммы изолируют из проб, находящихся в широком диапазоне климатических зон, но чаще встречается между 16° и 35° широты в зонах с теплым климатом [1,2]. Микроскопический гриб *A. flavus* – продуцент микотоксина – афлатоксина В1. Проявление признаков глобального потепления, неудовлетворительное состояние промышленных зернохранилищ, не достаточно эффективная система мониторинга фитосанитарного состояния хранящегося зерна

делают актуальными исследования, направленные на разработку ускоренного и чувствительного метода для точной идентификации вышеуказанного возбудителя [3,4]. Исходя из вышеизложенного, цель настоящего исследования – апробация разработанной тест-системы для идентификации фитопатогенных грибов *A. flavus* на основе ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Апробацию разработанной авторами тест-системы для индикации и идентификации *A. flavus* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» проводили на 21 штамме микроорганизмов: *A. flavus*, в том числе депонированный штамм (*Aspergillus flavus* VKM No. F-25) во ВКМ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований» РАН (положительный контроль) и 20 полевых штаммах, выделенных из проб кукурузы (зерно, вегетативная масса), полученных из разных природно-географических зон Российской Федерации (пробы были получены из Краснодарского и Ставропольского краев, Ульяновской, Самарской, Воронежской, Ростовской, Белгородской, Курской, Орловской, Калининградской и Московской областей. Идентификацию полевых штаммов, выделенных от растений с признаками заболеваний, проводили анализируя культурально-физиологические признаки, используя определители В.И. Билай, Э.З. Коваль (1988) и др. [5-7].

Материалы: реакционная смесь Био Мастер HS-Taq ПЦР (2×), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с» – 12, центрифуга/вортекс для пробирок, центрифуга-встряхиватель медицинская серии CM-50M, твердотельный термостат TDB-120, амплификатор детектирующий ДТ (ДНК-технология, Россия); система праймеров: прямой праймер (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, обратный праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTACCTTCCCGAGA; флуоресцентный краситель: HEX, зонд – CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, гаситель BHQ2, лабораторная посуда.

Выделение нуклеиновых кислот из моноспоровых культур *A. flavus* осуществляли, применяя набора реагентов «ЛИРА+» (Вектор Бест, РФ) по алгоритму, рекомендованному производителем.

Результаты

Для разработки системы молекулярно-генетической идентификации методом ПЦР-РВ авторами был выбран участок генома *Aspergillus flavus* strain CA14 4,044,380..4,045,732 п.н.

На основании полученной последовательности ДНК указанного выше фрагмента гена нами были подобраны праймеры для проведения ПЦР. Их специфичность была проверена так же при помощи NCBI BLAST-primer. Был разработан и, впоследствии, оптимизирован алгоритм постановки реакции с применением интеркалирующего красителя SYBR Green: предварительная денатурация – 95°C – 5 минут (1 цикл), денатурация – 95°C – 5 сек, отжиг – 60°C – 15 сек (30 циклов). Эмпирически было установлено, что увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции, поэтому в наших дальнейших исследованиях были использована концентрация 9 pM каждого праймера на реакцию.

Был произведён подбор зонда для определения чувствительности разработанной тест-системы. Это зонд CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, в качестве флуоресцентного красителя был использован HEX, гасителя BHQ-2. После серии экспериментов была подобрана его оптимальная концентрация, которая составила 0,4 pM. Определены показатели цикла для постановки ПЦР-РВ с флуоресцентным красителем: предварительная денатурация – 95°C – 5 минут (1 цикл), денатурация – 95°C – 5 сек, отжиг – 60°C – 15 сек (50 циклов).

В результате изучения чувствительности разработанного протокола для индикации и идентификации *A. flavus* методом РВ-ПЦР с детекцией по каналу HEX, установлено, что она составляет 10³ клеток.

Апробация разработанной тест-системы для идентификации бактерий *A. flavus* методом ПЦР-РВ проводилась на двадцати полевых штаммах и референс-штамме *A. flavus* VKM No. F-25, который был использован в качестве положительного контроля. Результаты исследований представлены на рисунках 1-2.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Нех	Результат
A7	К+	25,0	+
B7	<i>Aspergillus</i> spp. 84		-
C7	<i>Aspergillus</i> spp. 85		-
D7	<i>Aspergillus</i> spp. 87	27,8	+
E7	<i>Aspergillus</i> spp. 88		-
F7	<i>Aspergillus</i> spp. 89	26,9	+
G7	<i>Aspergillus</i> spp. 90	24,3	+
H7	<i>Aspergillus</i> spp. 91	26,4	+
A8	<i>Aspergillus</i> spp. 93	31,4	+
B8	<i>Aspergillus</i> spp. 94	33,5	+
C8	<i>Aspergillus</i> spp. 95	34,7	+
D8	<i>Aspergillus</i> spp. 97		-
E8	<i>Aspergillus</i> spp. 99	32,1	+
F8	<i>Aspergillus</i> spp. 100	35,5	+
G8	<i>Aspergillus</i> spp. 101	36,8	+
H8	<i>Aspergillus</i> spp. 102	29,0	+
A9	<i>Aspergillus</i> spp. 103	28,1	+
B9	<i>Aspergillus</i> spp. 104	31,0	+
C9	<i>Aspergillus</i> spp. 105		-
D9	<i>Aspergillus</i> spp. 106	32,2	+
E9	<i>Aspergillus</i> spp. 107	25,9	+
F9	К-		-

Рисунок 1 – Апробация разработанной тест-системы для детекции *A. flavus* методом ПЦР-РВ

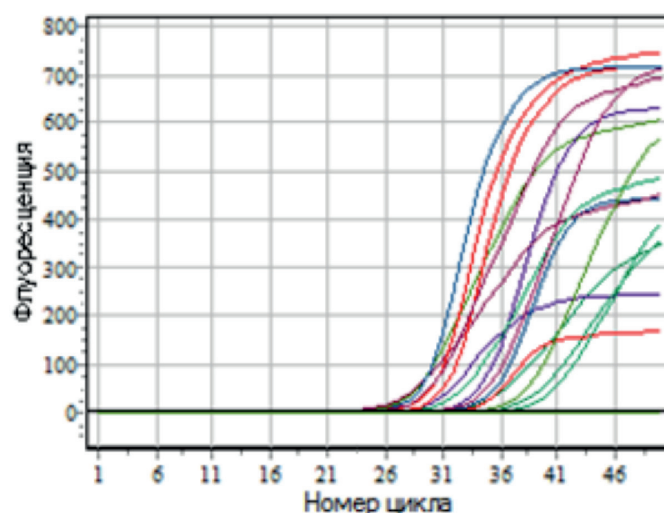


Рисунок 2 – Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла

В ходе эксперимента нами было подтверждено, что из 20 выделенных проб кукурузы с признаками заболеваний штаммов микроскопических грибов, первично идентифицированных как *A. flavus*, только пятнадцать полевых штаммов относятся к данному виду на основании проведенных молекулярно-генетических исследований.

Обсуждение

Общеизвестно, что загрязнение сельскохозяйственных культур афлатоксинами остается серьезной проблемой во всем мире, характеризуется дополнительными угрозами для здоровья людей и животных. Все чаще регистрируются случаи, связанные с увеличением числа случаев аспергиллеза, вызванного *A. flavus* [1, 8]. В настоящее время для детекции и идентификации фитопатогенов применяют диагностические системы, основанные на двух методах иммуноферментном анализе (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В Российской Федерации подавляющее большинство лабораторий, рутинно проводящих диагностику фитопатогенов, в качестве основного метода используют иммуно-ферментный метод (ИФА), уступающий методу ПЦР по чувствительности и специфичности [3]. С.М. Игнатьева с коллективом соавторов (2019) разработала мультиплексную ПЦР-тест-систему «HRM-Zygo-Asp» в режиме реального времени (РВ) с анализом кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения (НЕМ) для выявления и идентификации аспергиллов (только до рода) и мукоморлицетов [15]. Известно, что компанией ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» производится и успешно применяется в медицинской практике коммерческая тест-система для иммуноферментной диагностики аспергиллеза «Аспергилл-IgG-ИФА-БЕСТ» [16]. Иностранскими компаниями также производятся тест-системы для идентификации фитопатогенов рода *Aspergillus* iQ-Check *Aspergillus* PCR Detection Kit (Bio-Rad), *A. flavus* Standard Kit (Primerdesign, Великобритания), MycoReal Kit *Aspergillus* (ingenetix GmbH, Austria), 2-Color *Aspergillus* qPCR Detection Kits (SPEX CertiPrep, LLC, США).

Заключение

Авторами был проведен направленный поиск микроскопических грибов *A. flavus*, участвующих в поражении кукурузы. Новый подход к тестированию изолятов подтвердил принадлежность 15 выделенных штаммов к виду *A. flavus* из 20 идентифицированных в составе микобиоты кукурузы с признаками, проявляющимися как загнивание корней и увядание. Авторами была использована оригинальная тест-система для детекции *A. flavus* методом ПЦР-РВ на основании использования специфичного участка *A. flavus* strain CA14 4,044,380..4,045,732 п.н, состоящая прямого праймера (f) 5'-3' GGGCCCCGAGCAAGAATAC, обратного праймера (r) 3'-5' ACGAGTTGTACCTTCCCGAGA, флуоресцентного красителя – HEX, зонда - CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, гасителя - BHQ2, (оптимальная концентрация – 0,4 рМ). Протокол постановки реакции включал предварительную денатурацию – 95°C - 5 минут (1 цикл), денатурацию - 95°C – 5 сек, отжиг – 60°C – 15 сек (50 циклов).

Финансирование: Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200367-8.

Конфликт интересов: авторы не имеют конфликта интересов.

Литература

- 1 Amaike S., Keller N. P. *Aspergillus flavus* // Annual review of phytopathology. – 2011. – Vol. 49. – No. 1. – P. 107-133.
- 2 Gourama H., Bullerman L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review // Journal of Food protection. – 1995. – Vol. 58. – No. 12. – P. 1395-1404.
- 3 Rudramurthy S. M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management // Journal of Fungi. – 2019. – Vol. 5. – No. 3. – P. 55.
- 4 Cho H. J. et al. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus* // Cells. – 2022. – Vol. 11. – No. 18. – P. 2796.

- 5 Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 с.
- 6 Билай В.И. Основы общей микологии. – Киев, Вища школа, 1980. – 360 с.
- 7 Рябинин И.А. Разработка ключа для видовой идентификации *Aspergillus spp.* – возбудителей заболеваний человека, циркулирующих в Северо-Западном округе России / И.А. Рябинин, С.С. Расулова // «Профилактическая медицина-2017»: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 6–7 декабря 2017 года. Ч. 2. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017. – 312 с.
- 8 Klich M.A. Identification of common *Aspergillus species*. – Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002. – 116 p.
- 9 Стахеев А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании таксономии и специфической идентификации токсинпродуцирующих грибов рода *Fusarium*: успехи и проблемы / А.А. Стахеев, Л.В. Самохвалова, Д.Ю. Рязанцев, С.К. Завриев // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – №3. – С. 275-284.
- 10 Игнатьева С.М. Апробация мультиплексной тест-системы «HRM-Zygo-Asp» на клиническом материале больных мукормикозами / С.М. Игнатьева, В.А. Спиридонова, Т.С. Богомолова, Ю.Л. Авдеенко, Ю.В. Борзова, С.Н. Хостелиди, О.В. Шадривова, М.О. Попова, Ю.А. Чудиновских, И.С. Зюзгин, О.С. Успенская, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21. – №4. – С. 36-42.

References

- 1 Amaike S., Keller N. P. *Aspergillus flavus* // Annual review of phytopathology. – 2011. – Vol. 49. – No. 1. – P. 107-133.
- 2 Gourama H., Bullerman L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review // Journal of Food protection. – 1995. – Vol. 58. – No. 12. – P. 1395-1404.
- 3 Rudramurthy S. M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management // Journal of Fungi. – 2019. – Vol. 5. – No. 3. – P. 55.
- 4 Cho H. J. et al. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus* // Cells. – 2022. – Vol. 11. – No. 18. – P. 2796.
- 5 Bilaj V.I., Koval' E.Z. Aspergilly. – Kiev: Naukova dumka, 1988. – 204 s.
- 6 Bilaj V.I. Osnovy obshchej mikologii. – Kiev, Vishcha shkola, 1980. – 360 s.
- 7 Ryabinin I.A. Razrabotka klyucha dlya vidovoj identifikacii *Aspergillus spp.* – vzbuditelej zabolevanij cheloveka, cirkuliruyushchih v Severo-Zapadnom okruge Rossii / I.A. Ryabinin, S.S. Rasulova // «Profilakticheskaya medicina-2017»: sbornik nauchnyh trudov Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem. 6–7 dekabrya 2017 goda. CH. 2. – SPb.: Izd-vo SZGMU im. I.I. Mechnikova, 2017. – 312 s.
- 8 Klich M.A. Identification of common *Aspergillus species*. – Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002. – 116 p.
- 9 Staheev A.A. Molekulyarno-geneticheskie metody v issledovanii taksonomii i specificheskoy identifikacii toksinproduciruyushchih gribov roda *Fusarium*: uspekhi i problemy / A.A. Staheev, L.V. Samohvalova, D.Yu. Ryazancev, S.K. Zavriev // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. – 2016. – Т. 51. – №3. – С. 275-284.
- 10 Ignat'eva S.M. Aprobaciya mul'tipleksnoj test-sistemy «HRM-Zygo-Asp» na klinicheskom materiale bol'nyh mukormikozami / S.M. Ignat'eva, V.A. Spiridonova, T.S. Bogomolova, Yu.L. Avdeenko, Yu.V. Borzova, S.N. Hostelidi, O.V. Shadrivova, M.O. Popova, Yu.A. Chudinovskih, I.S. Zyuzgin, O.S. Uspenskaya, N.V. Vasil'eva // Problemy medicinskoj mikologii. – 2019. – Т. 21. – №4. – С. 36-42.

ASPERGILLUS FLAVUS-ТІ ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ ӘДІСІМЕН ИНДИКАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ АНЫҚТАУ ҮШІН СЫНАҚ ЖҮЙЕСІН СЫНАҚТАН ӨТКІЗУ «НАҚТЫ УАҚЫТ» РЕЖИМІНДЕ

Н. Феоктистова *, Е. Сульдина , А. Мاستиленко , А. Ломакин 

П.А. Столыпин атындағы Ульяновск мемлекеттік аграрлық университеті,
Федералды мемлекеттік бюджеттік жоғары білім беру мекемесі. Ульяновск қ., Ресей
Федерациясы
feokna@yandex.ru

Аннотация: мақалада *Aspergillus flavus* микроскопиялық саңырауқұлақтарын «нақты уақыт режимінде» анықтаумен полимеразды тізбекті реакция әдісімен индикациялау және анықтау үшін сынақ жүйесін сынақтан өткізу бойынша зерттеу нәтижелері келтірілген. Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 және ugena 44.0 бағдарламалық жасақтамасын қолдану. *A. flavus* сынақ жүйесіне арнайы праймерлер кіреді: тікелей праймер (f) 5'-3' GGGCCCGCAAGAATAC, кері праймер (r) 3'-5' ACGAGTTGTACCTTCCCGAGA; флуоресцентті бояу: HEX, зонд - CGGTTTCGCTTTGTCATCGT, bhq2 сөндіргіш. Реакция ХАТТАМАСЫ: алдын ала денатурация-95 0C - 5 минут (1 цикл); денатурация - 95 0C - 5 сек, күйдіру - 60 0C-15 сек (50 цикл). Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентті бояу – ROX, сөндіргіш-BHQ-2. Тест жүйесінің сезімталдығы-1000 жасуша. Праймерлердің оңтайлы концентрациясы бір реакцияға әр праймердің 9 pM-ге тең. Зондтың оңтайлы концентрациясы-0,4 pM. Нәтижелер дихотомиялық кілттерді қолдану *A. flavus* фитопатогенді саңырауқұлақтарын мүмкіндігінше дәл ажыратуға мүмкіндік бермейтінін көрсетеді. Изоляттарды сәйкестендірудің жаңа тәсілі 15 оқшауланған штаммның *A. flavus* түріне жататындығын растады, 20 жүгері сынамасынан оқшауланған, тамырдың ыдырауы және солуды ретінде көрінетін және мәдени-морфологиялық қасиеттерін зерттеу негізінде *Aspergillus* ретінде алғаш рет терілген. Зерттеу тақырыптық жоспарға сәйкес жүргізілді – Ресей Федерациясы Ауыл шаруашылығы министрлігінің тапсырмасы, ғылыми-зерттеу институтының тіркеу нөмірі 122030200367-8.

Түйін сөздер: *Aspergillus flavus*; сынақ жүйесі; полимеразды тізбекті реакция; сәйкестендіру; жүгері; көрсеткіш

APPROVAL OF THE TEST-SYSTEM FOR THE INDICATION AND IDENTIFICATION OF ASPERGILLUS FLAVUS BY THE METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE “REAL TIME” MODE

N. Feoktistova *, E. Suldina , A. Mastilenko , A. Lomakin 

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin,
Ulyanovsk, Russian Federation
feokna@yandex.ru

Abstract: the article presents the results of studies on approbation of a test system for the indication and identification of microscopic fungi *Aspergillus flavus* by the polymerase chain reaction method with real-time detection. Using software Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 and UGENA 44.0. The test system for *A. flavus* includes specific primers: forward

primer (f) 5'-3' GGGCCCGCAGCAAGAATAC, reverse primer (r) 3'-5' ACGAGTTGTCACCTTCCCGAGA; fluorescent dye: HEX, probe - CGGTTCGCTTTGGTCATCGT, quencher BHQ2. Reaction protocol: preliminary denaturation - 95 °C - 5 minutes (1 cycle); denaturation - 95 °C - 5 sec, annealing - 60 °C - 15 sec (50 cycles). Probe: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, fluorescent dye - ROX, quencher - BHQ-2. The sensitivity of the test system is 1000 cells. The optimal concentration of primers was set equal to 9 pM of each primer per reaction. The optimal probe concentration is 0.4 pM. The results obtained indicate that the use of dichotomous keys does not allow the most accurate differentiation of phytopathogenic fungi *A. flavus*. A new approach to the identification of isolates confirmed the belonging of 15 isolated strains to the species *A. flavus* out of 20 isolated from corn samples with signs that manifest themselves as root rot and wilting, and initially typed as *Aspergillus* based on the study of cultural and morphological properties. The study was carried out according to the thematic plan-task of the Ministry of agriculture of the Russian Federation, the registration number of the INIS RTD 122030200367-8.

Keywords: *Aspergillus flavus*; test system, polymerase chain reaction; identification; corn; indication