

УДК 632.4:630*165.3

С. В. Пантелеев, О. Ю. Баранов

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

**ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРАЙМЕРОВ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФОМОЗА ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ
МЕТОДОМ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

В статье рассмотрены основные аспекты разработки ПЦР тест-системы для диагностики фомоза лесных древесных видов и видоспецифической идентификации возбудителей инфекции. На основании использования методов секвенирования нового поколения на базе Ion PGM Torrent проведено определение нуклеотидной последовательности генома одного из доминирующих патогенов в лесных питомниках Беларуси – возбудителя фомоза сеянцев хвойных пород *Phoma sp.1* (размер генома \approx 40 млн. пар нуклеотидов). По результатам секвенирования аннотирована последовательность рибосомальной ДНК *Phoma sp.1* – 7540 пар оснований. Данный регион был выбран в качестве генетического маркера при разработке ПЦР тест-системы для диагностики фомоза лесных древесных растений, так как характеризуется видоспецифичностью и консерватизмом внутри вида. С использованием специального программного обеспечения Primer3web version 4.0.0 и Primer Blast проведена оптимизация термодинамических параметров видоспецифической полимеразной цепной реакции (SS-PCR) и сконструированы праймеры для идентификации возбудителей фомоза (50 пар). Функциональность праймеров проверена в базе данных международного генного банка GenBank Национального центра биотехнологической информации (США) с использованием программ nucleotide Blast и Primer Blast. Установлено, что разработанный набор характеризуется различной степенью специфичности к фомоподобным грибам: от отдельных видов до рода. Размер амплифицируемых продуктов (70–190 п.н.) оптимально подходит для проведения количественной оценки возбудителей фомоза в клетках растений с использованием метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR).

Ключевые слова: ДНК, ПЦР, праймеры, фомоз.

S. V. Panteleev, O. Yu. Baranov

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus

**HIGHLIGHTS OF PRIMER DESIGN FOR DIAGNOSIS
OF PHOMA BLIGHT OF FOREST TREE SPECIES
USING SPECIES-SPECIFIC PCR METHOD**

The article describes the main aspects of the development of a PCR test systems for the diagnosis of Phoma Blight of forest tree species and species-specific identification of the causative agents. Using next-generation sequencing methods based on Ion PGM Torrent conducted determination of the nucleotide sequence of the genome of one of the dominant pathogens in forest nurseries of Belarus – *Phoma sp.1*, causative agent of Phoma blight of coniferous seedlings (genome size \approx 40 million base pairs). According to the results of full genome sequencing annotated sequence of ribosomal DNA of *Phoma sp.1* – 7540 base pairs. This region was chosen as a genetic marker in the development of a PCR test system for the diagnosis of Phoma blight of forest tree species, because it is characterized by species-specific and conservatism within the species. Using special software Primer3web version 4.0.0 and Primer Blast optimized thermodynamic parameters of species-specific polymerase chain reaction (SS-PCR) and primers designed to identify the causative agents of Phoma blight (50 pairs). The functionality of the primers tested in a database of GenBank of National Center for biotechnological information (US) using programs nucleotide Blast and Primer Blast. It was found that the developed set is characterized by varying degrees of specificity of phoma-like fungi from individual species to genus. The size of the amplified product (70–190 bp) optimally suited for quantifying causative agents of Phoma blight in plant cells using the method of real-time PCR.

Key words: DNA, PCR, primers, Phoma blight.

Введение. Грибы *Phoma* были описаны как патогены растений итальянским микологом и ботаником П. А. Саккардо еще в XIX в. [1]. Однако масштабное изучение данных возбудителей болезней было начато лишь во второй половине XX в. голландскими учеными Цен-

трального научно-исследовательского бюро по микологии и Службы карантина растений при Нидерландском Министерстве сельского хозяйства, охраны природы и качества продовольствия Нидерландской королевской академии наук. Основной вклад в исследование фо-

моза растений внесли, в частности, голландские микологи Г. Боэрема с сотрудниками, которые на протяжении 40 лет проводили детальные исследования гербария и чистых культур грибов, описали множество видов *Phoma* и их синонимов. На основании морфологических и физиологических данных ученые разделили фомоподобные грибы на девять секций. Результатом их многолетних трудов явилось руководство по идентификации видов *Phoma* [2].

В отличие от огромного количества фитопатогенных грибов, представленных в литературе, число описанных видов *Phoma*, несмотря на существующие определители, до сих пор является низким. Это связано с тем, что возбудители фомоза являются таксономически проблематичной группой в связи с бесполом характером большинства видов, высокой морфологической изменчивостью в естественных условиях и полифилией [3]. Современное состояние знаний о систематике рода продвинулось не намного дальше системы Саккардо.

Современные методы на основе изучения ДНК могут в значительной степени способствовать идентификации и таксономии видов грибов. Тем не менее, уровень исследований с использованием высокомолекулярных подходов для определения видов *Phoma* и видовых комплексов в этом роде является относительно незначительным [3, 4].

В настоящее время данные по видоспецифической ПЦР-диагностике возбудителей фомоза представлены для единичных патогенов человека и сельскохозяйственных растений [3]. В связи с этим целью работы является разработка ПЦР тест-системы для диагностики фомоза лесных древесных видов и видоспецифической идентификации возбудителей инфекции.

Основная часть. Фитопатологический анализ с использованием генетических методов, направленный на выявление определенного вида патогена, может быть выполнен с помощью технологии видоспецифической ПЦР (SS-PCR). Данный метод позволяет игнорировать генетический материал других видов микромицетов, что повышает диагностическую чувствительность выявления определенного вида патогена. Основным этапом при разработке диагностических тест-систем, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), является дизайн праймеров. Конструирование специфических для вида праймеров основано на изучении полиморфизма на уровне ДНК. В качестве маркерного региона была выбрана последовательность ядерной ДНК: IGS-18S-ITS1-5,8-ITS2-28S, которая содержит гены, кодирующие структурные компоненты рибосом – рРНК, а также межгенные спейсеры ITS (Internal transcribed spacer)

и IGS (Intergenic spacer). Данный регион является величиной видоспецифичной и постоянной внутри вида. Эта особенность рДНК-маркера позволила использовать данный признак как диагностический критерий при проведении видовой идентификации. Однако информация о нуклеотидной структуре оперона рДНК видов *Phoma* в международном генном банке Национального центра биотехнологической информации представлена не в полном объеме.

С целью установления полной структуры ДНК на базе Ion PGM Torrent проведено полногеномное секвенирование возбудителя фомоза семян хвойных пород *Phoma sp.1*, одного из доминирующих патогенов в лесных питомниках Беларуси. По результатам секвенирования генома была аннотирована полная последовательность локуса рДНК *Phoma sp.1* – 7540 пар оснований.

На основании полученных данных с использованием специального программного обеспечения Primer3web version 4.0.0 [5] и Primer Blast [6] проведен дизайн праймеров для специфической диагностики видов *Phoma*. Видоспецифическая ПЦР характеризуется высокими требованиями к специфичности реакции. Поэтому при конструировании праймеров необходимо придерживаться ряда параметров. При несоответствии термодинамических показателей степени специфичности сконструированные праймеры могут послужить причиной неспецифической амплификации и образования димеров, снижающих или подавляющих образование продукта. Оптимально праймер должен иметь размер от 15 до 30 нуклеотидов, так как его длина пропорциональна эффективности отжига. Пара праймеров должна иметь примерно одинаковую температуру плавления (разница не должна превышать 4–6°C). В противном случае функциональность их будет некорректной. Праймер должен обладать 100%-й комплементарностью по отношению к сайту-мишени и не распознавать близкие по нуклеотидному составу последовательности других видов. В структуре праймеров должна отсутствовать внутренняя гомология и гомология между ними, чтобы предотвратить образование «шпилек», димеров и прочих частично двухцепочечных структур [7].

С учетом перечисленных критериев для увеличения производительности и повышения качества анализа в программной среде проводилась оптимизация термодинамических параметров в ходе ПЦР. Условия подбора праймеров с помощью программного обеспечения были следующие: температура плавления праймеров (T_m), °C – 63–66; различия в температурах плавления праймеров, не более – 3°C; максимальное

количество GC-нуклеотидов на 3'-конце праймера – 2; длина праймера – 19–25; GC-состав праймеров – 30,0–70,0%; наибольшее количество G-повторов – 3; максимальная стабильность 3'-конца, ΔG – 9,0 ккал/моль; максимально допустимое сходство с некомплементарными последовательностями – 12; максимально допустимое сходство с эктопическими сайтами в последовательности-мишени – 12; максимально допустимая сумма сходства пары праймеров (по одному для каждого праймера) с некомплементарными последовательностями – 20; максимально допустимое суммированное сходство обоих праймеров с эктопическими сайтами в последовательности-мишени – 24; максимальная комплементарность – 8; максимальная комплементарность 3'-конца – 3; максимальная длина мононуклеотидных повторов – 5; Длина ампликона – 70–200 п.н.

В соответствии с заданными параметрами для маркерного локуса IGS-18S-ITS1-5,8-ITS2-28S ядерной ДНК было сконструировано 50 пар праймеров, функциональность которых проверена в базе данных международного генного банка Национального центра биотехнологической информации (США) с использованием программ nucleotide Blast и Primer Blast. Установлено, что разработанный набор характеризуется различной степенью специфичности к фомоподобным грибам: от отдельных видов до рода. Сконструированные праймеры позволяют выявлять представителей всех, описанных согласно классификации Г. Бозрема, 9-ти секций возбудителей фомоза. Однако особое внимание было уделено представителям секций *Phoma* и *Peyronallaea* как наиболее многочисленным и распространенным инфекционным агентам фомозной гнили по данным молекулярно-фитопатологических обследований в лесных питомниках РБ [8].

Размер амплифицируемых продуктов (70–190 п.н.) оптимально подходит для проведения оценки фитопатогенов в клетках растений с использованием метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). Данный метод позволяет проводить одновременно детекцию и количественное определение содержания патогена в образце (титр). Установление титра патогена в дальнейшем может быть использовано для оценки устойчивости и толерантности растений.

Основным критерием идентификации вида является получение амплифицированного продукта при заданных параметрах ПЦР. Дополнительным критерием подтверждения видоспе-

цифической амплификации является специфический размер получаемого ампликона. На следующем этапе исследования будет проведена экспериментальная апробация разработанного набора праймеров с использованием коллекции ДНК *Phoma spp.* из чистых культур грибов и пораженного растительного материала.

Дальнейшие исследования будут направлены на разработку праймеров, специфичных для видоопределяющих полиморфных локусов митохондриального генома (митохондрия) возбудителей фомоза.

Заключение. На основании использования методов секвенирования нового поколения на базе Ion PGM Torrent проведено определение нуклеотидной последовательности генома одного из доминирующих патогенов в лесных питомниках Беларуси – возбудителя фомоза сеянцев хвойных пород *Phoma sp.1* (размер генома \approx 40 миллионов пар нуклеотидов). По результатам секвенирования аннотирована последовательность рибосомальной ДНК *Phoma sp.1* – 7540 пар оснований.

Данный регион был выбран в качестве генетического маркера при разработке ПЦР тест-системы для диагностики фомоза лесных древесных растений, так как характеризуется видоспецифичностью и консерватизмом внутри вида. С использованием специального программного обеспечения Primer3web version 4.0.0 и Primer Blast проведена оптимизация термодинамических параметров видоспецифической полимеразной цепной реакции (SS-PCR) и сконструированы праймеры для идентификации возбудителей фомоза (50 пар). Функциональность праймеров проверена в базе данных международного генного банка Национального центра биотехнологической информации (США) с использованием программ nucleotide Blast и Primer Blast.

Установлено, что разработанный набор характеризуется различной степенью специфичности к фомоподобным грибам: от отдельных видов до рода. Размер амплифицируемых продуктов (70–190 п.н.) оптимально подходит для проведения количественной оценки возбудителей фомоза в клетках растений с использованием метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). По результатам экспериментальной апробации разработанного набора праймеров, наиболее перспективные конструкции будут включены в ПЦР тест-систему для диагностики фомоза лесных древесных видов и видоспецифической идентификации возбудителей инфекции.

Литература

1. Saccardo P. A. *Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate sporologico dispositurum* // *Michelia*. 1880. Vol. 2. P. 1–38.

2. Boerema G. H., Gruyter J., Noordeloos M. E., Hamers M. E. *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture // CABI publishing. 2004. P. 1–448.
3. Aveskamp M. Phylogeny and DNA-based identification in *Phoma* and related genera. Wageningen. 2014. P. 18–24.
4. Aveskamp M. M., Verkley G. J., Gruyter J., Murace M. A., Perello A., Woudenberg J. H., Groenewald J. Z., Crous P. W. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties // *Mycologia*. 2009. Vol. 101. P. 363–382.
5. Online tool to design and analyze primers for PCR: Primer3web version 4.0.0 [Electronic resource]. URL: <http://primer3.ut.ee/> (date of access: 10.01.2015).
6. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (date of access: 10.01.2015).
7. Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G. S. General Concepts for PCR Primer Design // *PCR Methods App.* 1993. Vol. 3. P. 30–37.
8. Баранов О. Ю., Пантелеев С. В., Ярмолович В. А., Романенко М. О. Молекулярно-генетические аспекты диагностики и идентификации возбудителей фомоза // Труды БГТУ. 2014. № 1: Лесное хоз-во. С. 198–201.

References

1. Saccardo P. A. Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate sporologico dispositorum. *Michelia*, 1880, vol. 2, pp. 1–38.
2. Boerema G. H., Gruyter J., Noordeloos M. E., Hamers M. E. *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. *CABI publishing*, 2004, pp. 1–448.
3. Aveskamp M. Phylogeny and DNA-based identification in *Phoma* and related genera. Wageningen, 2014, pp. 18–24.
4. Aveskamp M. M., Verkley G. J., Gruyter J., Murace M. A., Perello A., Woudenberg J. H., Groenewald J. Z., Crous P. W. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*, 2009, vol. 101, pp. 363–382.
5. Online tool to design and analyze primers for PCR: Primer3web version 4.0.0 [Electronic resource]. URL: <http://primer3.ut.ee/> (date of access: 10.01.2015).
6. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (date of access: 10.01.2015).
7. Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G. S. General Concepts for PCR Primer Design. *PCR Methods App.*, 1993, vol. 3, pp. 30–37.
8. Baranov O. Yu., Panteleev S. V., Yarmolovich V. A., Romanenko M. O. Molecular genetic aspects of diagnostics and identification of Phoma Blight agents. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], 2014, no. 1, pp. 198–201 (in Russian).

Информация об авторах

Пантелеев Станислав Викторович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии Института леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: pukidesu@gmail.com

Баранов Олег Юрьевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии Института леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Information about the authors

Panteleev Stanislav Victorovich – Ph. D. Biology, senior research fellow, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel, 246001, Republic of Belarus). E-mail: pukidesu@gmail.com

Baranov Oleg Yur'evich – Ph. D. Biology, leading researcher, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel, 246001, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Поступила 16.02.2015