Original article

МРНТИ 34.15.23 **https://doi.org/10.70264/jbr.v1.1.2025.4**

ОЦЕНКА МЕТОДА ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК ДЛЯ БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Оксана Хапилина[1], Айнур Туржанова[1*] Асем Туменбаева[1] и Руслан Календарь[2]

[1]Лаборатория геномики растений и биоинформатики, ТОО «Национальный центр биотехнологии» г.Астана, Казахстан
[2] ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, г.Астана, Казахстан

* Автор-корреспондент: Туржанова А.С., turzhanova-ainur@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Данное исследование представляет новую технологию экстремальной амплификации ДНК фитопатогенных грибов, позволяющую генерировать целевые продукты размером свыше 2000 п.н. Специально разработанные праймеры позволяют совмещать этапы отжига и элонгации, что значительно сокращает общее время амплификации. В результате последующего рестрикционного анализа ПЦР-продуктов была создана рестрикционная карта с предложенным набором из шести рестриктаз, позволяющая проводить видовую идентификацию фитопатогенов. Разработанный метод экстремальной амплификации является высокоэффективным и чувствительным вариантом ПЦР, отличающимся тем, что реакция проходит без полной денатурации геномной ДНК. Время элонгации определяется длиной целевого продукта, а сокращение трехэтапного цикла (денатурация, отжиг и элонгация) до двухэтапного (денатурация и отжиг/элонгация) значительно повышает эффективность. Данный метод идентификации может быть использован как экспресс-метод диагностики в фитопатологических лабораториях, не обладающих оборудованием для секвенирования, что улучшает скорость и точность идентификации фитопатогенов.

Ключевые слова: *Экстремальная цепная реакция, фитопатогенные грибы, 18S, быстрая идентификация, рестрикционный анализ*

Получено: 7 февраля 2025 г. / *Принято*: 31 марта 2025 г. / *Опубликовано*: 31 марта 2025 г.

© Автор(ы) 2025.

Цитирование: Хапилина, О., Туржанова, А., Туменбаева, А., Календарь, Р. (2025). Оценка метода экстремальной амплификации ДНК для быстрой идентификации фитопатогенных грибов. Journal of Biological Research, 1(1), 33-42. https://doi.org/10.70264/jbr.v1.1.2025.4.

1 ВВЕДЕНИЕ

Болезни зерновых культур, вызываемые грибами и грибоподобными организмами, наносят значительный ущерб производству и приводят к существенным экономическим потерям [1-3]. Изменения климата, активный импорт семян, интенсивный обмен семенным материалом внутри страны, обработки пшеницы узкоспециализированными фунгицидами способствуют появлению новых и расширению ареалов существующих видов грибов - возбудителей заболеваний злаковых растений [4]. Для эффективной борьбы с болезнями и контроля фитосанитарной обстановки необходим мониторинг видового состава патогенов и их внутривидовых группировок, а также разработка современных методов их быстрой и точной идентификации.

Идентификация патогенов по морфолого-культуральным признакам является наиболее используемым методом и часто вызывает затруднения при определении видового состава патогенной микофлоры [5]. Выделяемые изоляты могут быть стерильны, а при их выделении высока вероятность контаминации вторичной микобиотой [6]. Эти методы неэффективны в случае, если заболевание находится в начальной фазе развития или имеет место скрытое заражение семенного материала (латентная инфекция). Многие фитопатогенные виды не способны расти на питательной среде (например, возбудители ржавчины и многие виды головни), в связи с чем их невозможно выделить в чистую культуру. Поэтому выделение и анализ чистых культур не в полной мере отражает видовой состав патогенной микобиоты пшеницы.

Молекулярные методы обладают высокой универсальностью, относительной простотой и качеством проводимых исследований для решения различных диагностических задач, в том числе в обнаружении и идентификации возбудителей заболеваний [7]. Преимуществами молекулярных методов идентификации микроорганизмов являются быстрота и точность определения вида возбудителя; возможность определения видовой принадлежности без выделения гриба в чистую культуру [8].

В основном для геномной диагностики фитопатоге-

нов используются рибосомные гены, присутствующие у всех организмов. Последовательности высоковариабельных *ITS*-регионов ДНК долгое время являлись идеальной мишенью для генетической идентификации микромицетов. Существование различных баз данных, включающих последовательности большинства известных грибов, доступных для большинства пользователей, значительно облегчает задачи по идентификации фитопатогенов [9].

В этой связи очевидна необходимость разработки доступных и вместе с тем, высокоспецифичных экспресс методов идентификации возбудителей болезней растений [10].

Разработка современных методов выявления фитопатогенных микроорганизмов, их идентификация может значительно ускорять способы отбора здорового растительного материала, точной детекции вида заболеваний, формирования системы интегрированной защиты растений от возбудителей болезней [11, 12]. Точная идентификация фитопатогенных грибов важна для диагностики, прогнозирования эпифитотий, особенно для видов, которые трудно или невозможно культивировать.

Область внутреннего транскрибируемого спейсера (*ITS*) является предлагаемым штрих-кодом для грибов, поскольку она имеет видовое разрешение для очень широкого спектра грибов по сравнению с другими генами-маркерами грибов [13]. Однако многие таксоны грибов, полученные с помощью ITS-секвенирования в окружающей среде, часто можно идентифицировать исключительно на уровне царства или типа из-за отсутствия эталонных последовательностей или эталонных последовательностей, аннотированных только на высоких таксономических уровнях [9, 14].

Одним из последних достижений по усовершенствованию амплификации является метод экстремальной полимеразной реакции Xtreme Chain Reaction. (XCR) представляет собой запатентованный сверхбыстрый вариант ПЦР амплификации ДНК/РНК, включающий уникальную технологию термоциклирования, дизайна ПЦР праймеров и выбора мишени для амплификации [15, 16]. Используя стандартные ферменты и реагенты, реакция XCR адаптирована к любым существующим ПЦР приборам, реагентам и флуоресцентным зондам. Эффективность и специфичность данного метода значительно выше, в сравнении с традиционными методами, поскольку вместо денатурации всей геномной ДНК, при XCR используется только специфическая температура денатурации конкретной ДНК мишени, что приводит к минимуму образования неспецифических продуктов. Этот подход ускоряет амплификацию ДНК, так как диапазон температура между денатурацией и отжигом варьирует от 5°C до 15°C. Кроме того, время, требуемое для ПЦР, обратно пропорционально концентрациям критических реагентов. При увеличении концентрации праймеров и полимеразы в несколько раз, сокращается время прохождения цикла на 0,4-2 с. При специфичности 90% амплификация может занять всего 15 с. [15]. Значение экстремальной ПЦР заключается в ее потенциале для быстрой молекулярной диагностики, обеспечивающей возможность быстрой амплификации мишеней ДНК, что имеет решающее значение в ситуациях, когда жизненно важно быстрое выявление патогенов [17].

Целью нашего исследования является оценка эффективности молекулярно-генетических методов, основанных на технологии XCR, для идентификации фитопатогенных грибов пшеницы.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор материала

В качестве материалов исследований использовали фитопатогенные грибы (*Alternaria alternata, Alternaria infectoria, Alternaria tenuissima, Fusarium proliferatum, Fusarium oxysporum, Fusarium equiseti, Bipolaris sorokiniana, Cladosporium s.*), выделенные из пораженных растений пшеницы в различных регионах Казахстана предоставленные Научно-производственный центром зернового хозяйства имени А.И. Бараева. В качестве референтных штаммов использовались *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. Equiseti, B. sorokiniana*, *Cladosporium* spp., *A. infectoria*, *A. alternata*, *A. tenuissima* идентифицированные и предоставленные лабораторией микробиологии Научно-производственный центром зернового хозяйства имени А.И. Бараева.

2.2 Дизайн праймеров

Дизайн праймеров для проведения многолокусной экстремальной амплификации ДНК фитопатогенных грибов пшеницы, анализ олигонуклеотидов и множественное выравнивание ДНК последовательностей на EBI–EMBL портале: Clustal, Kalign , T–Coffee [18] и с помощью программы Multain [19]. Ген 18S рРНК был выбран в качестве целевого гена для данного исследования. Последовательности гена 18S рРНК у *Alternaria sp.*, *Bipolaris sp.*, *Cladosporium sp.* и *Fusarium sp.* были загружены из базы данных GenBank. Был разработан набор уникальных

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров, разработанных для экстремальной амплификации

Название праймера	Последовательность 5’-3’	Позиция	Температура отжига (°C)
5306 F	CTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCT	137-174	71
5307 F	GCTAAAAATCCCGACTTCGGAAGGGATGT	172-200	71
5308 F	GCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGC	171-199	73
5309 R	CAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAG	2297-2322	73
5310 R	CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT	1977-2004	73
5306 R	CTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCT	2297-2322	71
5307 R	GCTAAAAATCCCGACTTCGGAAGGGATGT	1977-2004	71

праймеров на основе консервативного региона, присутствующего у всех исследуемых видов грибов. Для проверки специфичности разработанных праймеров использовались программы FastPCR и онлайн-инструменты Java [20]. Кроме того, для разработки праймеров XCR применялась альтернативная программа PrimerExplorer V4 [21]

В результате анализа были разработаны 5 пар праймеров (Таблица 1) согласно инструкции [22] для экстремальной амплификации генов рРНК грибов, используя разработанные нами алгоритмы, реализованные в компьютерной программе FastPCR [23].

2.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК из фитопатогенных грибов проводили CTAB-методом с собственными модификациями [24]. Количественное определение концентрации ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific).

2.3 XCR аплификация и рестрикция

Для проведения XCR амплификации 18S рРНК использовали реакционную смесь на один образец, в объеме 20 µL, следующего состава: ДНК 40 нг, 1x Phire® Hot Start II буфер (содержащий 1.5 mM MgCl2), 0.5 µM праймер, 200µM dNTP, 0.2 µL Phire® Hot Start II ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific). Режим амплификации был следующим: 30 циклов 30 сек -94°C, 1 мин - 72°C.

Для рестрикции продуктов амплификации использовали реакционную смесь в объеме 10 µL следующего состава: 5µL ПЦР продукта, ферменты рестрикции с соответующими 1x буферными растворами с последующей инкубацией согласно инструкции производителя.

Электрофорез полученных продуктов рестрикции анализировали путем электрофореза в 1.5% агарозном геле (RESolute Wide Range, BIOzym) размером: 20 x 20 см, при 70 V, в течении 5 часов и визуализировали бромидом этидия. Гели были отсканированы на сканере Pharos FX Plus System (BioRad). Для определения длин фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса от 100-10,000 оснований GeneRules DNA ladder mix" (SM1173, Thermo Scientific) (на рисунках обозначается как M).

2.4 Статистический анализ

Результаты экспериментов анализировали с применением соответствующих методов описательной и сравнительной статистики (там, где это было уместно). Эффективность амплификации ДНК оценивали на основании успешности амплификации целевых фрагментов ДНК, их ожидаемого размера, а также воспроизводимости полученных ПЦР-продуктов. Анализ паттернов рестрикционных фрагментов проводили для определения их соответствия прогнозируемым профилям рестрикции и оценки их пригодности для дифференциации видов фитопатогенных грибов.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведен подбор праймеров для амплификации грибных ДНК последовательностей из GenBank. Наиболее вариабельные участки генов, такие как рРНК и интроны других генов (например, ATP binding protein, цитохром P-450), использовались для создания универсальных праймеров.

Подбор был ориентирован на универсальность разрабатываемых праймеров, поэтому анализировали внутренние транскрибируемые спейсеры генов рРНК, а также интроны различных генов грибов, относящихся к ATP binding protein, цитохром P-450, фосфоглицерат дегидрогеназа, PksC).

Для проверки праймеров была проведена амплификация ДНК с различными видами грибов, что позволило получить продукты ожидаемых размеров. Оптимизация условий амплификации, включающая градиент температур, привела к созданию методики экстремальной амплификации, позволяющей амплифицировать фрагменты длиной более 1000 п.н. Оптимизация экстремальной амплификации показала, что для получения высокоэффективных ПЦР-продуктов важны правильный выбор температуры и времени денатурации. ПЦР. Для дальнейших экспериментов было выбрано усредненное значение денатурации 94°C в течение 30 секунд, оптимальная температура отжига/элонгации была выбрана 72°C в течение 1 минуты.

В дальнейшем оценивали специфичность разработанного протокола экстремальной амплификации на штаммах рабочей коллекции (ДНК патогенов пшеницы рода

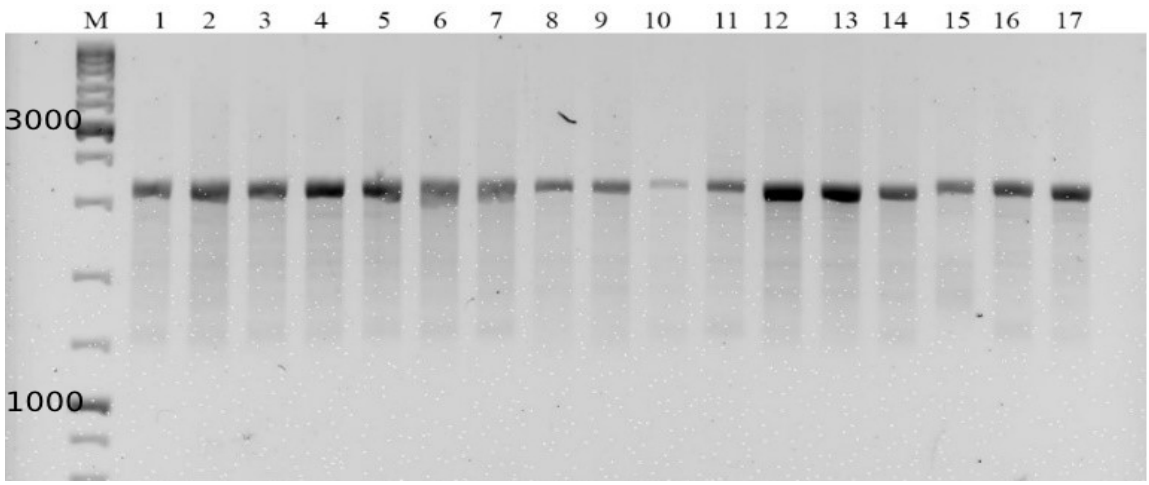


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами 5306-5309: M- маркер молекулярного веса для ДНК 100-10000 п.н.; 1-*2 A. alternata*; 3-4 – A. infectoria; 5-6 – *A. tenuissima*; 7-8 – *F. oxysporum*; 9-10 – *F. equiseti*; 11-12 – *F. proliferatum*; 13-15 – *C. cladosporioides*; 16-17 – *B. sorokiniana.*

Fusarium sp, Alternatia sp, Cladosporium sp , Bipolaris sp). В результате были получены целевые продукты ожидаемой длины 2400 п.н. при амплификации с праймерами 5306-5309 (рисунок 1).

Проведено секвенирование ПЦР-продуктов, что позволило идентифицировать рибосомные гены у ряда фитопатогенных грибов. Эти последовательности были размещены в GenBank под номерами MK828116-MK828121.

Для анализа были взяты мелкощепящие эндонуклеазы рестрикции TaqI, HhaI, MspI, Tail. RsaI, AluI. Использованные рестриктазы TaqI и HhaI имеют соответственно сайты узнавания TCGA и GCGC, тогда как рестриктазы AluI и MspI режут по сайтам AGCT и CCGG. Сайты узнавания рестриктаз TaiI и RsaI, соответственно ACGT и GTAC, содержат в своем составе все четыре нуклеотида. Такой подбор эндонуклеаз рестрикции может обеспечить универсальность при идентификации, имеющих как АТ-богатые, так и GC- богатые геномы. Все использованные рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволяет получать от 3 до 8 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 2400 пар нуклеотидов (рисунок 2).

Экстремальную амплификацию с последующей рестрикцией проводили в соответствии с разработанной технологией. По результатам исследований была проведена идентификация предоставленных «слепых» образцов (рисунок 3).

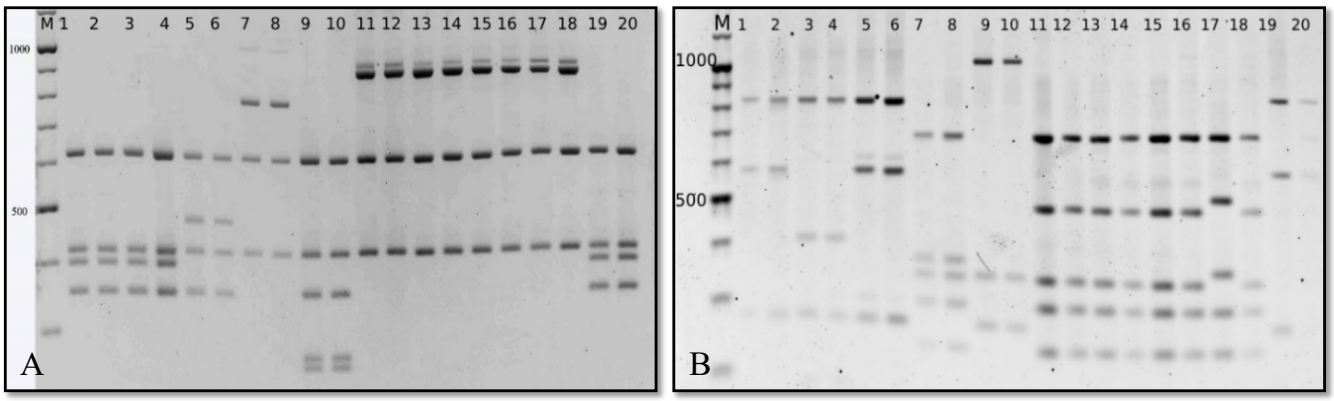


Рисунок 2 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации после обработки рестриктазой AluI (A), MspI (B): M - молекулярный маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10,000 пн), 1-4 *Fusarium proliferatum*, 5-6 *Fusarium oxysporum,* 7-8 *Bipolaris sorokiniana,* 9-10 *Cladosporium sp.,* 11-18 *Alternaria alternata,* 19-20 *A. tenuissima.*

4 ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная методика позволяет получить точные результаты и использовать ПЦР для идентификации фи-

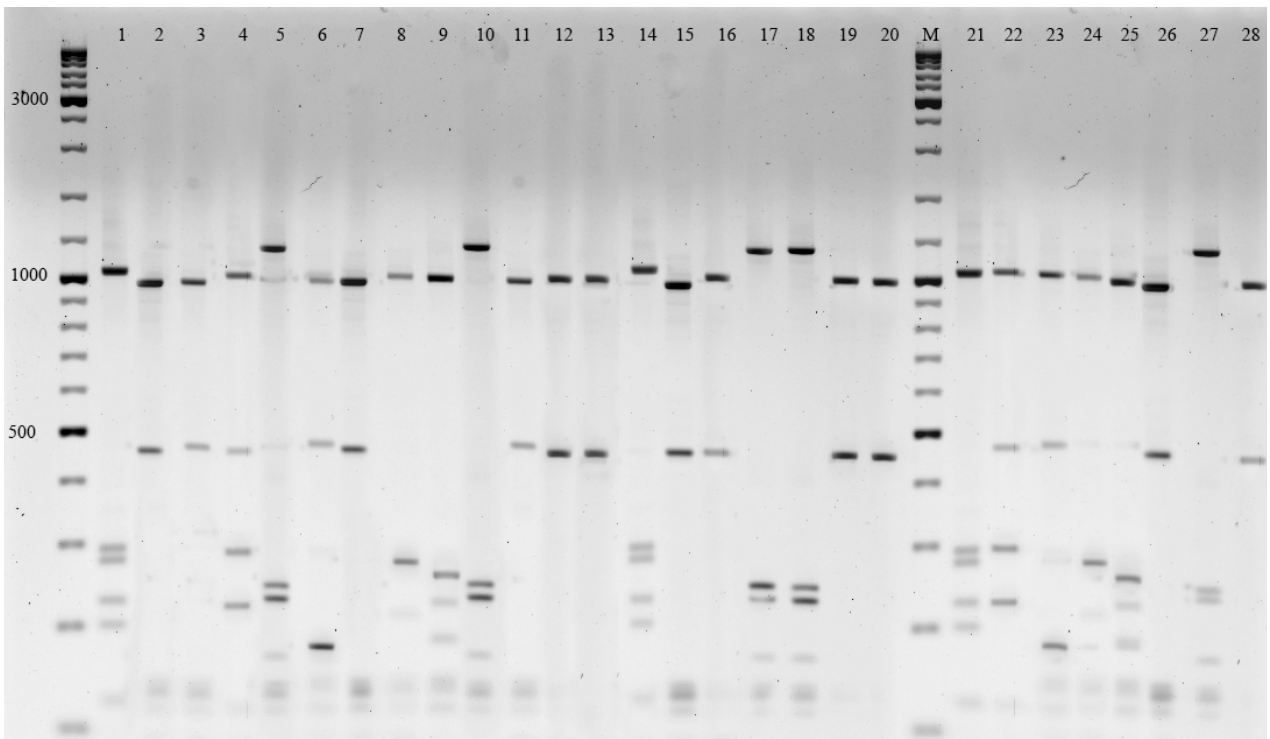


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов рестрикции HhaI целевого фрагмента, генерированного методом XCR с использованием праймеров 5306-5309: M - молекулярный маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10,000 пн), 1-20 неизвестные образцы (НПЦ ЗХ им. А.И. Бараева); Референтные штаммы: 21 - *F. proliferatum* , 22 - *F. solani* , 23 – *F. equiseti,* 24 - *B. sorokiniana*, 25- *Cladosporium* spp., 26 – *A. infectoria* , 27 - *A. alternata*, 28 - *A. tenuissima.*

топатогенных грибов пшеницы. Одним из главных преимуществ разработанной технологии XCR является высокая скорость и специфичность амплификации длинных ДНК-фрагментов.

Особое внимание уделялось дизайну праймеров, поскольку для точного анализа грибных сообществ подходящие ПЦР-праймеры должны полностью амплифицировать из пулов ДНК только последовательности грибов и исключить амплификацию не грибных последовательностей. Тем не менее, праймеры, избирательные к 18S рДНК грибов или *ITS* регионов, амплифицируют также гены негрибных организмов из-за высокого уровня сходства последовательностей между *18S* рДНК грибов и некоторых близких групп эукариот. При увеличении специфичности праймеров с их помощью можно амплифицировать только определенную группу грибов. В этой связи основные усилия были направлены на синтез универсальных праймеров, амплифицирующих длинные фрагменты рибосомальных генов.

Ген *18S* рРНК был выбран для детекции фитопатогенных грибов, поскольку он содержит как консервативные, так и переменные участки, что позволяет разработать универсальные праймеры для амплификации широкого спектра грибов. Он широко используется в таксономических и экологических исследованиях, обеспечивая высокую воспроизводимость результатов. Несмотря на возможность неспецифической амплификации негрибных последовательностей, *18S* рРНК остается одним из ключевых маркеров для идентификации грибов, особенно в комплексных образцах.

После анализа последовательностей, представленных в банке генов, в качестве мишени для подбора универсальных праймеров были отобраны последовательности транскрибируемых спейсеров, поскольку последовательности, кодирующие эти гены многокопийны, а их вариабельность позволит идентифицировать различные виды фитопатогенных грибов.

При разработке праймеров учитывали то, что амплификация будет происходить при экстремальном режиме при максимально возможной температуре, при этом праймеры должны быть универсальными для амплификации с различными видами патогенов. Основное требование к разрабатываемым праймерам – их способность фланкировать большой фрагмент *18S-28S* размером не менее 1500 п.н., поскольку детекция патогенов на основании сиквенсов коротких (500-600 п.н.) не всегда корректна.

Первоначальную проверку работоспособности праймеров для амплификации с ДНК различных видов микромицетов проводили по аналогии патентом, оптимизируя такие показатели как состав реакционной смеси [25], а также параметры циклирования, приведенные в наставлении к используемой полимеразе. В результате проведенного эксперимента все подобранные праймеры амплифицировали продукты ожидаемых размеров. Для дальнейшего объединения этапа отжига и элонгации проводили проверку работоспособности с изменением диапазона температур отжига и денатурации. При этом была понижена температура денатурации и повышена температура элонгации/отжига, анализ проводился с помощью опции амплификатора - градиента температур.

Оптимизация технологии экстремальной амплификации ПЦР продуктов длиной более 1000 п.н. необходимо учитывать время элонгации, а также кинетические и равновесные параметры полимеразы. Считается, что любая термостабильная полимераза способна работать в режиме экстремальной, но необходимо рассчитать время для работы. В ходе проведения экспериментов были протестированы Taq Polymerase, Phire HotStart polymerase II, DyNAzyme EXT/DreamTaq DNA Polymerase, где все используемые ферменты показали высокую эффективность амплификации. Далее проводили оптимизацию экстремальной амплификации, которая состоит из двух этапов амплификации: первый этап денатурации, второй совмещенный этап отжига/элонгации. На этапе оптимизации температуры отжига праймеров диапазон температур варьировал от 69°C до 79°C при продолжительности цикла от 30 секунд до 2 минут. В результате проведенного эксперимента получили продукт ожидаемой длины 2400 п.н. при температуре 69°C -72,8°C для отжига/элонгации. Таким образом, на основании максимальной эффективности XCR оптимальная температура отжига/элонгации была выбрана 72°C в течение 1 минуты.

Общая продолжительность амплификации в XCR составляет 60 минут, тогда как классическая ПЦР (при амплификации целевого продукта длиной 2400 п.н.) занимает 120 минут.

В результате проведенного исследования, следует, что данный метод является очень эффективным и высокочувствительным вариантом ПЦР, от которого отличается тем, что реакция протекает без полной денатурации геномной ДНК. Необходимое для элонгации время определяется длиной целевого продукта, а сокращение трехэтапного цикла (денатурация, отжиг и элонгация) до двухэтапного (денатурация, отжиг/элонгация) значительно сокращает общее время амплификации. Однако, при двухэтапной XCR следует учитывать температурный оптимум активности полимеразы (70-80°C).

В нашем исследовании картины рестрикции генов 18S РНК, полученные с использованием набора рестриктаз, могут служить основой для идентификации родовой принадлежности фитопатогенных грибов. Кроме того, метод рестрикционного анализа гораздо менее чувствителен к наличию примесей в ДНК по сравнению с полимеразной цепной реакцией, используемой для определения последовательности продукта гена 18S РНК.

Результаты «слепой» идентификации позволяют сделать вывод, что разработанный в процессе исследования метод идентификации фитопатогенных грибов пшеницы на основе высокоспецифичной экстремальной амплификации, имеет значительные преимущества (универсальность, точность и низкозатратность) и может в дальнейшем эффективно использоваться в качестве диагностических тест-систем для детекции фитопатогенных грибов [19]. Значимость экстремальной ПЦР заключается в ее потенциале для быстрой молекулярной диагностики, обеспечивая возможность быстрой амплификации ДНК-мишеней, что имеет решающее значение в ситуациях, когда жизненно важна быстрая идентификация патогенов Кроме того, высокая скорость этого метода открывает возможности для диагностики на месте,

значительно сокращая время, необходимое для получения результатов [26].

Таким образом, в результате исследований нам удалось впервые разработать технологию экстремальной амплификации ДНК фитопатогенных грибов, позволяющую генерировать целевой продукт размером от 2000 п.н. Отличительной особенностью, разработанной нами технологии XCR, является возможность получения длинного (более 2000 п.н.) продукта амплификации, в то время как в настоящее время получен продукт размером не более 500 п.н.

Учитывая тот факт, что технологические и экономические возможности многих лабораторий на данном этапе не позволяют проводить идентификацию фитопатогенных грибов, используя секвенирование длинных, как в нашем случае, продуктов амплификации, дальнейшие исследования были направлены на поиск эффективных методов идентификации фитопатогенных грибов, без использования дорогостоящих технологий. Для использования при анализе необходим подбор эндонуклеаз рестрикции, которые бы имели сайты узнавания в 18S регионе разных видов грибов, поражающих зародышевую зону семян пшеницы.

Наличие на электрофореграммах слабых минорных полос может быть обусловлено как частичным недогидролизом исходной амплифицированной ДНК, так и тем, что в грибах обычно присутствует несколько копий гена 18S РНК, и некоторые из них могут содержать вариации в своей последовательности. На основании полученных данных при ПЦР-ПДРФ полиморфизма гена18S рРНК анализе составлена рестрикционная карта, с предложенным набором из 6 рестриктаз, позволяющая использовать данные рестрикции для видовой идентификации фитопатогенов (Рисунок 4).

Эффективность метода была продемонстрирована на нескольких видах микромицетов, включая *Alternaria* sp, *Fusarium* sp и *Cladosporium* sp. Высокая специфичность праймеров и стабильные результаты амплификации свидетельствуют о надёжности разработанной технологии для диагностики.

Разработанный метод амплификации и рестрикционного анализа был сопоставлен с ранее опубликованными данными. В отличие от стандартных методов ПЦР-амплификации [27], предложенный протокол экстремальной амплификации позволяет получать более длинные фрагменты (>2000 п.н.) с высокой специфичностью.

Использование рестрикционного анализа с подбором эндонуклеаз на основе структуры мишеней ДНК подтверждает результаты исследований [28], где показано, что применение четырех нуклеотидных рестриктаз позволяет достичь высокой точности идентификации.

Данный метод позволяет идентифицировать возбудителей болезней за очень короткий промежуток времени, что имеет значение при выявлении карантинных возбудителей, различных мониторинговых исследованиях, при таможенном контроле качества пищевой продукции в случаях экспорта или импорта. Кроме того, высокая скорость этого метода открывает возможности для диагностики на месте, значительно сокращая время, необходимое для получения результатов. В дальнейшем планируется исследование специфичности предложенных праймеров путем их тестирования на ДНК нецелевых организмов, а также проведение анализа возможных неспецифических продуктов амплификации.

Адаптация ПЦР для достижения таких экстремальных скоростей имеет значение не только в диагностике, но и в исследованиях, судебной медицине и различных других областях, которые требуют быстрой и точной амплификации ДНК [29].

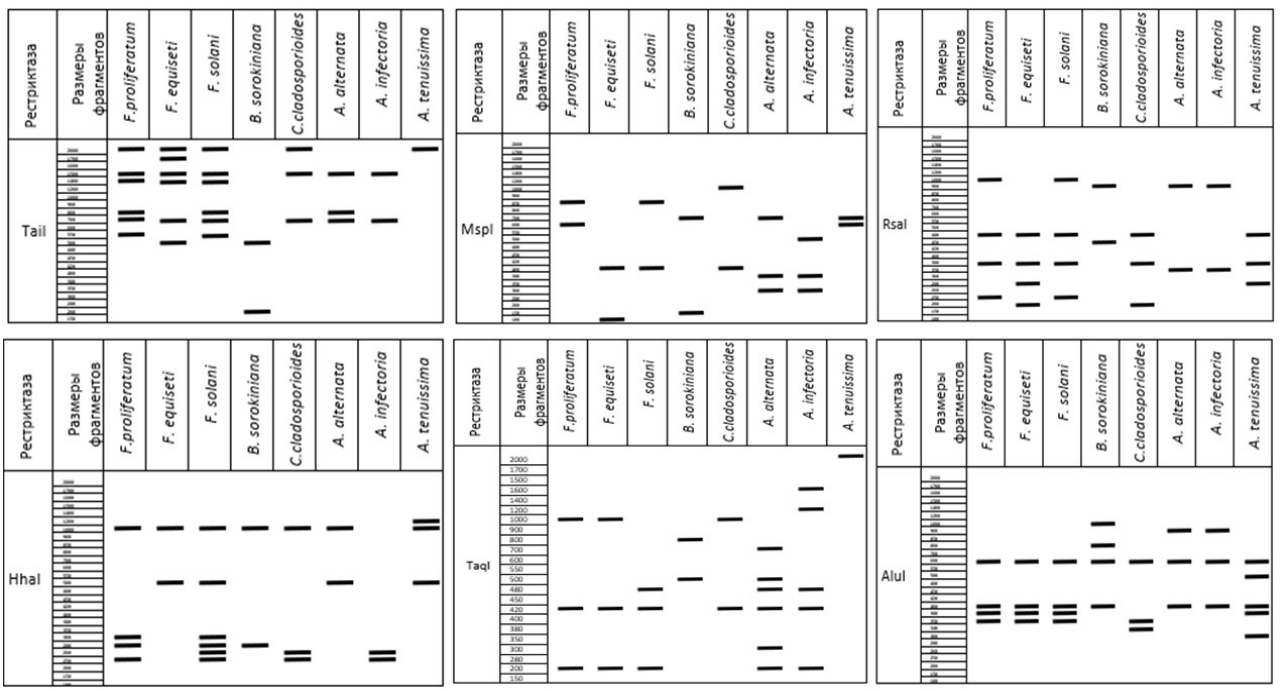


Рисунок 4 – Рестрикционные карты для идентификации фитопатогенных грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, разработанная технология экстремальной амплификации ДНК фитопатогенных грибов представляет собой важное достижение в молекулярной диагностике. Она позволяет быстро получать целевые продукты размером от 2000 п.н. с использованием специализированных праймеров, что сокращает общее время амплификации благодаря объединению этапов отжига и элонгации.

XCR метод отличается высокой чувствительностью, не требуя полной денатурации геномной ДНК, и подходит для экспресс-идентификации в фитопатологических лабораториях без сложного оборудования для секвенирования. Таким образом, он значительно улучшает диагностику фитопатогенов и открывает новые перспективы для исследований в данной области.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.Х., Р.К., и А.Т.: концептуализация, дизайн исследования; О.Х.: написание – подготовка оригинального черновика; А.Т.: курирование данных и лабораторные эксперименты; А.Т. и О.Х.: анализ данных; О.Х. и А.Т.: редактирование и окончательное утверждение рукописи. Все авторы внесли вклад в статью и одобрили представленную версию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа подготовлена в рамках програмно-целевого финансирования BR24992881 «Разработка клеточных, геномных и протеомных технологий для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ОТКРЫТЫЙ ДОСТУП

Эта статья лицензирована в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International, которая разрешает любое некоммерческое использование, распространение, распространение и воспроизведение на любом носителе или в любом формате, при условии указания автора(ов) и источника, предоставления ссылки на лицензию Creative Commons и указания того, изменяли ли вы лицензированный материал. Чтобы просмотреть копию этой лицензии, посетите https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McMullen M., Bergstrom G., De Wolf E., Dill-Macky R., Hershman D., Shaner G., Van Sanford D. A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: Fusarium Head Blight // Plant Dis. – 2012. – Vol. 96(12). – P. 1712-1728. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE.

2. Singh M. P., DiFonzo C. D., Fusilier K. M., Kaur H., Chilvers M. I. J. C., Forage, Management T. Insect ear-feeding impacts Gibberella ear rot and deoxynivalenol accumulation in corn grain // Crop, Forage & Turfgrass Management. – 2024. – Vol. 10(1). – P. e20258. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE 10.1002/cft2.20258.

3. Ekom D.C., Benchekroun M.N., Udupa S.M., Iraqi D. Wheat Genetic Transformation as Efficient Tools to Fight against Fungal Diseases // Journal of Agricultural Science and Technology A 5. – 2015. – Vol. 5(3). – P. 153-161. https://doi.org/10.17265/2161-6256/2015.03.001.

4. Juroszek P., von Tiedemann A. Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review // European Journal of Plant Pathology. – 2013. – Vol. 136(1). – P. 21-33. https://doi.org/10.1007/s10658-012-0144-9.

5. Narayanasamy P. Detection of Fungal Pathogens in Plants. In: Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis:. Springer, Dordrecht. – 2011. – P. 5-199. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4_2.

6. Hashmi M.H.F., Ghaffar A. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley // Pakistan Journal of Botany. – 2006. – Vol. 38(1). – P. 185-192.

7. Taylor E., Bates J., Kenyon D., Maccaferri M., Thomas J. Modern molecular methods for characterisation and diagnosis of seed-borne fungal pathogens // Journal of Plant Pathology. – 2001. – Vol. 83. - P. 75–81.

8. Kulik T. Detection of Fusarium tricinctum from cereal grain using PCR assay // J. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 49(3). – P. 305-311. https://doi.org/10.1007/BF03195628.

9. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Consortium F.B. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – Vol. 109(16). – P. 6241-6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109.

10. Lievens B., Thomma B.P. Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice // Phytopathology. – 2005. – Vol. 95(12). – P. 1374-80. https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1374.

11. Hariharan G., Prasannath K. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review // Front Cell Infect Microbiol. – 2020. – Vol. 10. – P. 600234. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234.

12. Dehne H.-W., Adam G., Diekmann M., Frahm J., Mauler-Machnik A., Halteren P.V. Diagnosis and Identification of Plant Pathogens . Proceedings of the 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology, September 9–12, 1996, Bonn, Germany. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0043-1.

13. Ryberg M., Kristiansson E., Sjokvist E., Nilsson R.H. An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity // New Phytol. – 2009. – Vol. 181(2). – P. 471-477. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02667.x.

14. Galagan J.E., Henn M.R., Ma L.J., Cuomo C.A., Birren B. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology // Genome Research. – 2005. – Vol. 15(12). – P. 1620-1631. https://doi.org/10.1101/gr.3767105.

15. Farrar J.S., Wittwer C.T. Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15–60 seconds // Clinical

Chemistry. – 2015. – Vol. 61(1). – P. 145-153. https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228304.

16. FLUORESENTRIC, Inc., assignee. DNA amplification technology. United States patent US WO/2016/007914. 2016.

17. Wittwer C.T. Rapid Cycle and Extreme Polymerase Chain Reaction // Clinical Applications of Nucleic Acid AmplificationSpringer. – 2023. – P. 257-266. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2950-5_14.

18. EMBL-EBI. Unleashing the potential of big data in biology. http://www.ebi.ac.uk

19. PRABI-GERLAND RHONE-ALPES BIOINFORMATIC POLE GERLAND SITE. Institute of Biology and Protein Chemistry. https://npsa-prabi.ibcp.fr.

20. http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/

21. http://primerdigital.com/fastpcr.html

22. Turzhanova A., Rukavitsyna I., Khapilna O., Kalendar R. Optimization of DNA extraction from filamentous fungi Alternaria sp. and Fusarium sp. // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2018. – Vol. 3. – P. 35-41.

23. Wan Rasni W. H. N., Yahaya N., Mohamed Rehan M. Recombinase polymerase amplification and their application in phytopathogen detection // Malaysian Journal of Science Health & Technology. – 2022. – Vol. 8(2). – P. 14-24. https://doi.org/10.33102/mjosht.v8i2.254.

24. Hariharan G., Prasannath K. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: a mini review // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. –Vol. 10. – P. 600234. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234.

25. Kauserud H. ITS alchemy: on the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology // Fungal Ecology. – 2023. – Vol. 65. – P. 22. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274.

26. Achilonu C.C., Gryzenhout M., Marais G.J., Ghosh S. Differential detection of *Alternaria alternata* haplotypes isolated from Carya illinoinensis using PCR-RFLP analysis of Alt a1 gene region // Genes. – 2023. – Vol. 14(5). – P. 1115. https://doi.org/10.3390/genes14051115.

27. Pramunadipta S., Widiastuti A., Wibowo A., Suga H., Priyatmojo A. Development of PCR-RFLP technique for identify several members of Fusarium incarnatum-equiseti species complex and Fusarium fujikuroi species complex // The Plant Pathology Journal. – 2022. – Vol. 38(3). – P. 254. https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.12.2021.0184.

28. Branco I., Choupina A. Bioinformatics: new tools and applications in life science and personalized medicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – Vol. 105(3). – P. 937-951. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11056-2.

29. Yang S., Rothman R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings // Lancet Infect Dis. – 2004. – Vol. 4(6). – P. 337-48. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8.

REFERENCES

1. McMullen M., Bergstrom G., De Wolf E., Dill-Macky R., Hershman D., Shaner G., Van Sanford D. A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: Fusarium Head Blight // Plant Dis. – 2012. – Vol. 96(12). – P. 1712-1728. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE.

2. Singh M. P., DiFonzo C. D., Fusilier K. M., Kaur H., Chilvers M. I. J. C., Forage, Management T. Insect ear-feeding impacts Gibberella ear rot and deoxynivalenol accumulation in corn grain // Crop, Forage & Turfgrass Management. – 2024. – Vol. 10(1). – P. e20258. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE 10.1002/cft2.20258.

3. Ekom D.C., Benchekroun M.N., Udupa S.M., Iraqi D. Wheat Genetic Transformation as Efficient Tools to Fight against Fungal Diseases // Journal of Agricultural Science and Technology A 5. – 2015. – Vol. 5(3). – P. 153-161. https://doi.org/10.17265/2161-6256/2015.03.001.

4. Juroszek P., von Tiedemann A. Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review // European Journal of Plant Pathology. – 2013. – Vol. 136(1). – P. 21-33. https://doi.org/10.1007/s10658-012-0144-9.

5. Narayanasamy P. Detection of Fungal Pathogens in Plants. In: Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis:. Springer, Dordrecht. – 2011. – P. 5-199. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4_2.

6. Hashmi M.H.F., Ghaffar A. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley // Pakistan Journal of Botany. – 2006. – Vol. 38(1). – P. 185-192.

7. Taylor E., Bates J., Kenyon D., Maccaferri M., Thomas J. Modern molecular methods for characterisation and diagnosis of seed-borne fungal pathogens // Journal of Plant Pathology. – 2001. – Vol. 83. - P. 75–81.

8. Kulik T. Detection of Fusarium tricinctum from cereal grain using PCR assay // J. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 49(3). – P. 305-311. https://doi.org/10.1007/BF03195628.

9. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Consortium F.B. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – Vol. 109(16). – P. 6241-6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109.

10. Lievens B., Thomma B.P. Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice // Phytopathology. – 2005. – Vol. 95(12). – P. 1374-80. https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1374.

11. Hariharan G., Prasannath K. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review // Front Cell Infect Microbiol. – 2020. – Vol. 10. – P. 600234. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234.

12. Dehne H.-W., Adam G., Diekmann M., Frahm J., Mauler-Machnik A., Halteren P.V. Diagnosis and Identification of Plant Pathogens . Proceedings of the 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology, September 9–12, 1996, Bonn, Germany. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0043-1.

13. Ryberg M., Kristiansson E., Sjokvist E., Nilsson R.H. An outlook on the fungal internal transcribed spacer

sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity // New Phytol. – 2009. – Vol. 181(2). – P. 471-477. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02667.x.

14. Galagan J.E., Henn M.R., Ma L.J., Cuomo C.A., Birren B. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology // Genome Research. – 2005. – Vol. 15(12). – P. 1620-1631. https://doi.org/10.1101/gr.3767105.

15. Farrar J.S., Wittwer C.T. Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15–60 seconds // Clinical Chemistry. – 2015. – Vol. 61(1). – P. 145-153. https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228304.

16. FLUORESENTRIC, Inc., assignee. DNA amplification technology. United States patent US WO/2016/007914. 2016.

17. Wittwer C.T. Rapid Cycle and Extreme Polymerase Chain Reaction // Clinical Applications of Nucleic Acid AmplificationSpringer. – 2023. – P. 257-266. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2950-5_14.

18. EMBL-EBI. Unleashing the potential of big data in biology. http://www.ebi.ac.uk

19. PRABI-GERLAND RHONE-ALPES BIOINFORMATIC POLE GERLAND SITE. Institute of Biology and Protein Chemistry. https://npsa-prabi.ibcp.fr.

20. http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/

21. http://primerdigital.com/fastpcr.html

22. Turzhanova A., Rukavitsyna I., Khapilna O., Kalendar R. Optimization of DNA extraction from filamentous fungi Alternaria sp. and Fusarium sp. // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2018. – Vol. 3. – P. 35-41.

23. Wan Rasni W. H. N., Yahaya N., Mohamed Rehan M. Recombinase polymerase amplification and their application in phytopathogen detection // Malaysian Journal of Science Health & Technology. – 2022. – Vol. 8(2). – P. 14-24. https://doi.org/10.33102/mjosht.v8i2.254.

24. Hariharan G., Prasannath K. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: a mini review // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. –Vol. 10. – P. 600234. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234.

25. Kauserud H. ITS alchemy: on the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology // Fungal Ecology. – 2023. – Vol. 65. – P. 22. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274.

26. Achilonu C.C., Gryzenhout M., Marais G.J., Ghosh S. Differential detection of *Alternaria alternata* haplotypes isolated from Carya illinoinensis using PCR-RFLP analysis of Alt a1 gene region // Genes. – 2023. – Vol. 14(5). – P. 1115. https://doi.org/10.3390/genes14051115.

27. Pramunadipta S., Widiastuti A., Wibowo A., Suga H., Priyatmojo A. Development of PCR-RFLP technique for identify several members of Fusarium incarnatum-equiseti species complex and Fusarium fujikuroi species complex // The Plant Pathology Journal. – 2022. – Vol. 38(3). – P. 254. https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.12.2021.0184.

28. Branco I., Choupina A. Bioinformatics: new tools and applications in life science and personalized medicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2021. – Vol. 105(3). – P. 937-951. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11056-2.

29. Yang S., Rothman R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings // Lancet Infect Dis. – 2004. – Vol. 4(6). – P. 337-48. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8.

EVALUATION OF AN EXTREME DNA AMPLIFICATION METHOD FOR RAPID IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Oxana Khapilina[1], Ainur Turzhanova[1*] Assem Tumenbayeva[1] and Ruslan Kalendar[2]

[1] Laboratory of Plant Genomics and Bioinformatics, LLP «National Center for Biotechnology,» Astana, Kazakhstan
[2] Private Institution «National Laboratory Astana,» Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan

[*] **Corresponding Author: A. Turzhanova., turzhanova-ainur@mail.ru**

ABSTARCT

This study presents a novel technology for extreme DNA amplification of phytopathogenic fungi, enabling the generation of target products over 2000 bp in length. Specially designed primers allow the annealing and elongation steps to be combined, significantly reducing the overall amplification time. As a result of subsequent restriction analysis of the PCR products, a restriction map was created using a proposed set of six restriction enzymes, allowing species-level identification of phytopathogens. The developed extreme amplification method is a highly efficient and sensitive variant of PCR, distinguished by the fact that the reaction proceeds without complete denaturation of genomic DNA. The elongation time is determined by the length of the target product, and the reduction of the three-step cycle (denaturation, annealing, and elongation) to a two-step process (denaturation and annealing/elongation) significantly enhances efficiency. This identification method can be used as a rapid diagnostic tool in phytopathological laboratories that lack sequencing equipment, improving both the speed and accuracy of phytopathogen identification.

Key words: *Extreme Chain Reaction, phytopathogenic fungi, 18S Region, rapid identification.*

Type: Original Research. https://doi.org/10.70264/jbr.v1.1.2025.4

ФИТОПАТОГЕНДІ САҢЫРУЛАРДЫ ЖЫЛДАМ АНЫҚТАУ ҮШІН ДНҚ-НЫҢ ЭКСТРЕМАЛДЫ КҮШЕУ ӘДІСІН БАҒАЛАУ

Оксана Хапилина[1], Айнур Туржанова[1]* Асем Туменбаева[1] және Руслан Календарь[2]

[1]Өсімдіктер геномикасы және биоинформатика зертханасы, «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Астана, Қазақстан
[2] «Ұлттық зертхана Астана» ЖМ, Назарбаев Университеті, Астана, Қазақстан

* Корреспондент авторы: Туржанова А.С., turzhanova-ainur@mail.ru

АБСТРАКТ

Бұл зерттеу фитопатогенді саңырауқұлақтардың ДНҚ экстремалды күшейту технологиясын ұсынады, бұл 2000 ж.н.-ден асатын мақсатты өнімдерді алуға мүмкіндік береді. Арнайы әзірленген праймерлер жасыту және ұзарту кезеңдерін біріктіруге мүмкіндік беріп, бұл жалпы күшейту уақытын айтарлықтай қысқартады. ПТР өнімдерін кейіннен рестрикциялау талдауының нәтижесінде алты шектеу ферменттерінің ұсынылған жиынтығымен фитопатогендердің түрлерін анықтауға мүмкіндік беретін рестрикция картасы жасалды. Жасалған экстремалды күшейту әдісі ПТР-ның жоғары тиімді және сезімтал нұсқасы болып табылады, реакцияның геномдық ДНҚ толық денатурациясынсыз жүруімен сипатталады. Ұзарту уақыты мақсатты өнімнің ұзындығымен анықталады және үш сатылы циклді (денатурация, жасыту және ұзарту) екі сатылы циклге (денатурация және жасыту/ұзарту) қысқарту тиімділікті айтарлықтай жақсартады. Бұл сәйкестендіру әдісі фитопатогенді сәйкестендіру жылдамдығы мен дәлдігін арттыратын секвенирлеу жабдығы жоқ фитопатологиялық зертханаларда экспресс-диагностикалық әдіс ретінде қолданылуы мүмкін.

Түйін сөздер: *экстремалды тізбекті реакция, фитопатогенді саңырауқұлақтар, 18S аймағы, жылдам идентификация, ресирикация талдауы.*