

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФІТОПАТОГЕННИХ І ТОКСИКОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM*, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ЗЕРНА *TRITICUM AESTIVUM* L.

У статті наведено результати вивчення фітопатогенних і токсигенних властивостей штамів роду *Fusarium*, виділених із зерна *Triticum aestivum* L. З'ясовано, що культури грибів характеризуються переважно помірним рівнем фітотоксичності. Серед 9 досліджених ізолятів лише *Fusarium* sp. КМА-17 виявився токсичним. На підставі аналізу фітотоксичного профілю досліджених культур встановлено їхню сортову спеціалізацію: сорт пшениці ярої Тюбалт був більш сприйнятливим до фітотоксичного впливу порівняно із сортом пшениці озимої Воала. Усі досліджені штами спричиняли патологічні зміни в піддослідних рослин, зокрема побуріння пагонів і корінців проростків, затримку росту та в'янення. Культури грибів *Fusarium* sp. мали середній ступінь агресивності, їх було зараховано до другої групи патогенності. З'ясовано, що жоден з ізолятів не містив у своєму геномі гена *PSK13*, що кодує полікетидсинтазу, залучену до біосинтезу зеараленону. На підставі комплексу ознак охарактеризовані нами культури *Fusarium* sp. можна вважати нетоксигенними.

Ключові слова: фітопатогенні гриби, фітотоксичність, агресивність, токсигенність, зеараленон, *Fusarium*.

### Вступ

Інтенсифікація сільського господарства дуже часто призводить до порушення структури мікробних асоціацій у межах певних еколого-трофічних груп мікроорганізмів у результаті зміни співвідношення між окремими представниками на користь зростання кількості фітопатогенних і токсигенних видів та одночасного зниження чисельності їхніх природних антагоністів [1]. Унаслідок цього агрофітоценози, в яких здійснюється екстенсивне господарство, значною мірою схильні до хвороб, серед яких провідна роль як за поширенням, так і за збитками, які вони спричиняють, належить грибним захворюванням. Серед культурних рослин найбільш уразливими до інфікування є злакові [2], а найпоширенішими токсигенними видами грибів, які виявляються в зернових культурах, – представники роду *Fusarium*. Останні широко розповсюджені в природі, здатні до синтезу мікотоксинів, здебільшого є факультативними паразитами, що спричиняють масові захворювання рослин лише за певних умов. Дія різних видів роду *Fusarium* на рослини визначається сукупністю патогенних властивостей, які значно варіюють у різних представників унаслідок високого рівня природного поліморфізму, зумовленого генетичною мінливістю та наявністю різних типів вегетативної сумісності [3].

Гетерогенність природних популяцій фузарієвих грибів залежить від комплексу абіотичних та біотичних факторів і призводить до формування певного екотипу з притаманними йому специфічними особливостями розвитку.

З огляду на це проблема диференціювання патогенних і токсигенних представників роду *Fusarium* з метою подальшого розроблення стратегій контролю їхнього поширення в агрофітоценозах набуває все більшої актуальності [4-6]. Тому метою роботи було вивчення фітопатогенних і токсигенних властивостей представників роду *Fusarium*, виділених із зерна *Triticum aestivum* L., та виявлення у них генів, залучених до біосинтезу мікотоксинів.

### Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були 9 штамів моноспорових культур грибів роду *Fusarium*, виділених із зерна *Triticum aestivum* L. та охарактеризованих нами раніше [7].

Для визначення загальної фітотоксичності метаболітів фузарієвих грибів їх культивували в рідкому живильному середовищі Чапека (СЧ), як описано в роботі [8]. У колби з середовищем поміщали диски міцелію грибів, що виростили на щільному СЧ (рис. 1), та культивували впродовж 7 діб за постійного перемішування 120 об./хв і температури

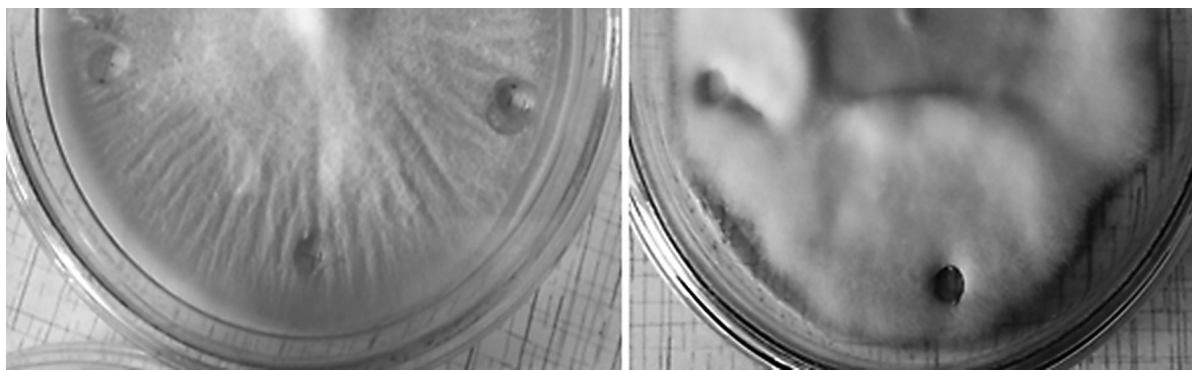


Рис. 1. Фрагменти колоній міцеліальних грибів із вирізаними дисками

22 °С. Культуральну рідину (КР) отримували шляхом фільтрування для відокремлення міцелію.

Простерилізоване, як описано в роботі [9], насіння пшениці сорту Вдала чи Тюбалт (по 5 насінин у 5 повтореннях) замочували в КР кожного з 9 ізолятів упродовж 24 год. Як контроль використовували насіння, асептично замочене у СЧ (контроль впливу середовища) та H<sub>2</sub>O (негативний контроль). Після закінчення часу експозиції насіння пророщували методом вологих камер протягом 7 діб за температури 22 °С. Наявність метаболітів із фітотоксичною активністю (ФА, %) визначали за кількістю пророслих насінин та довжиною коренів, розраховуючи її за формулою (1):

$$ФА = 100 - (D_g / D_k \times 100), \quad (1)$$

де  $D_g$  – середня довжина коренів проростків у кінці досліді у варіанті (мм);  $D_k$  – середня довжина коренів проростків у кінці досліді в контролі (мм).

Токсичними вважали ті культури грибів, метаболіти яких призводили до зниження схожості насіння або пригнічення росту проростків і коренів не менше ніж на 30 % порівняно з контролем [8].

Агресивність культур оцінювали на проростках пшениці сорту Вдала, як описано в методичних рекомендаціях [6]. Простерилізоване та активоване насіння [9] пророщували протягом 3 діб за температури 22 °С. Проростки інокулювали спорами грибів, розміщуючи агарові диски (рис. 1) 5-добових культур грибів так, щоб диск торкався насінин, та вирощували в рулонах фільтрувального паперу, розміщуючи по 5 інфікованих насінин в одному рулоні. Для кожного ізоляту досліді проводили у 5 повтореннях. Інтенсивність ураження проростків визначали на 5–7-му добу після інокуляції за бальною шкалою, відповідно до якої: 0 – симптомів ураження немає; 1 – ураження поверхневих тканин до 20 %; 2 – інтенсивність ураження до 50 %, немає додаткових корінців; 3 – інтенсивність ураження більше ніж

50 %. Після обліку результатів проростки залишали у вологих камерах ще на 7 діб до максимальної споруляції грибів, інтенсивність якої встановлювали, як описано в роботі [5]. Концентрацію спор визначали шляхом підрахунку макро- та мікроконідій у камері Горяєва–Тома (збільшення  $\times 600$ , мікроскоп Мікмед-5 (ЛМО, Росія)) та розраховували інтенсивність спорутворення за формулою (2):

$$N = \left( \frac{a \times 1000}{h \times S} \right) \times n, \quad (2)$$

де  $N$  – кількість спор в 1 мл суспензії;  $a$  – середня кількість спор у квадратах камери Горяєва–Тома;  $h$  – глибина камери (0,1 мм);  $S$  – площа квадрата сітки (0,04 мм<sup>2</sup>);  $n$  – розведення вихідної суспензії.

Інтенсивність спорутворення на міцелії з проростків встановлювали, як описано вище, та оцінювали за бальною шкалою: 0 – спорношення немає; 1 – наявні поодинокі конідієносці та конідії; 2 – спорношення < 1 млн шт./мл; 3 – спорношення > 1 млн шт./мл. Життєздатність спор визначали за кількістю пророслих конідій на 3-тню добу шляхом мікроскопії суспензії спор за бальною шкалою: 0 – пророслих спор немає; 1 – наявні поодинокі пророслі спори; 2 – наявно < 50 % пророслих спор; 3 – наявно > 50 % пророслих спор. Індекс ураження проростків ( $n$ ), за яким надалі визначали ступінь агресивності штаму, розраховували за формулою (3):

$$n \cong \frac{\sum(k \times a) \oplus \sum(k \times b) \oplus \sum(b \times c)}{k \times i} \times 20, \quad (3)$$

де  $k$  – кількість проростків;  $a$  – ураженість проростків, бал;  $b$  – інтенсивність спорутворення, бал;  $c$  – кількість спор, що проросли, бал;  $i$  – інкубаційний період, днів; 20 – постійний коефіцієнт.

Ступінь агресивності культур грибів встановлювали за допомогою шкали, наведеної в таблиці [6].

Таблиця. Групи агресивності ізолятів фітопатогенних грибів залежно від індексу ураження проростків [6]

Індекс ураження	Ступінь агресивності	Група патогенності
Нижче ніж 10	Слабоагресивний	I
10–35	Середньоагресивний	II
Вище ніж 36	Сильноагресивний	II

Виділення ДНК з міцелію дослідних грибів здійснювали, як описано в роботах [10,11], з деякими модифікаціями. Для отримання міцелію моноспорові культури кожного зі штамів культури вали в рідкому середовищі Чапека за температури 28 °С протягом 3 діб. Отриманий шляхом фільтрування міцелій тричі асептично відмивали dH<sub>2</sub>O, підсушували на повітрі та заморожували в рідкому азоті. Після чого його гомогенізували за асептичних умов до порошкоподібного стану і використовували для виділення геномної ДНК ЦТАБ-методом [10]. Концентрацію екстрагованої ДНК у зразках оцінювали спектрофотометрично. ПЛР проводили з праймерами (Invitrogen, Швеція) до гена полікетидсинтази *PKS13* з послідовністю, запропонованою в роботі [11]: 5'-CATCTTGGTCTTGTGAGGA-3' (прямий), 5'-CCTTATGCTCATCGACATG-3' (зворотний). Реакцію ПЛР проводили за умов, описаних у роботі [12], з реакційною сумішшю HOT FIREPol® Blend Master Mix 4 відповідно до інструкцій виробника. Як контроль на ДНК грибів застосовували універсальний фрагмент 28S рРНК грибів та послідовності праймерів, описані в роботі [13]. Детекцію продуктів реакції здійснювали у 2 % агарозному гелі за таких умов: 80 А, тривалість 45 хв. Для визначення молекулярних мас продуктів реакції під час електрофорезу застосовували маркери мас (Thermo Fisher Scientific, США).

Для оцінювання впливу фітотоксинів дослідних культур грибів застосовували непараметричний критерій Даннета, а для визначення агресивності – параметричний критерій Ньюмана–Кейлса. Перед застосуванням цих критеріїв за допомогою непараметричного критерію Краскла–Уоліса або однофакторного дисперсійного аналізу перевіряли нульову гіпотезу про рівність усіх середніх. У разі, коли розраховані значення перевищували критичні, різницю вважали статистично достовірною на відповідному рівні значущості ( $p = 0,05$  чи  $p = 0,01$ ) [14,15].

### Результати та обговорення

Представники роду *Fusarium* здатні спричинити низку захворювань рослин, уражуючи повсюдно сільськогосподарські культури. До таких хвороб належать судинні в'янення, фузаріоз

колоса та насіння, стеблові та кореневі гнилі, а також рак рослин [16]. Патологічна дія представників роду *Fusarium* визначається наявністю і ступенем прояву факторів патогенності, які можуть суттєво відрізнитися в різних видів і штамів. Значну роль у розвитку захворювань як чинників патогенності відіграють токсини, тому з'ясування їхньої наявності та впливу на культури рослин є важливим для передбачення подальшого розвитку патологічного процесу [17].

Зважаючи на те, що фітопатогенним мікроміцетам може бути властивий певний тип спеціалізації, тобто здатність паразитувати на певних рослинах, органах і тканинах, загальну фітотоксичність та агресивність грибів роду *Fusarium sp.* характеризували щодо двох сортів пшениці м'якої – ярої сорту Тюбалт та озимої сорту Вдала. Під час встановлення фітотоксичної активності визначали дію метаболітів досліджених культур на проростання насіння, застосовуючи як контроль рідке живильне середовище Чапека та водогінну воду. Було показано, що рідке середовище Чапека виявляло незначний пригнічувальний вплив на ріст корінців сорту Тюбалт, натомість щодо насіння сорту Вдала подібного впливу виявлено не було.

Дослідження фітотоксичних властивостей представників роду *Fusarium* дало змогу з'ясувати, що метаболіти всіх досліджених ізолятів знижували здатність проростання насіння пшениці м'якої ярої сорту Тюбалт по-різному (рис. 2). З усіх досліджених культур лише один штам виявляв високий ступінь токсичності, оскільки показник його фітотоксичної активності сягав 42 %. Незважаючи на те, що метаболіти інших культур грибів роду *Fusarium* характеризувалися нижчою фітотоксичністю порівняно зі згаданим вище ізолятом, вони також виявляли здатність пригнічувати ріст проростків пшениці (рис. 2). На підставі показників фітотоксичної активності штами *Fusarium sp.* КМА-10, КМА-11 і КМА-14 було об'єднано в групу з помірною фітотоксичністю. Втім, ця активність у межах групи варіювала залежно від штаму. Зокрема, наблизився до межі токсичності 30 % *Fusarium sp.* КМА-14, показник фітотоксичної активності якого становив 29,3 %. Менш токсичними можна вважати штами *Fusarium sp.* КМА-11 та КМА-10. Показники їхньої фітотоксичної активності відповідно становили 27,6 і 26,4 %.

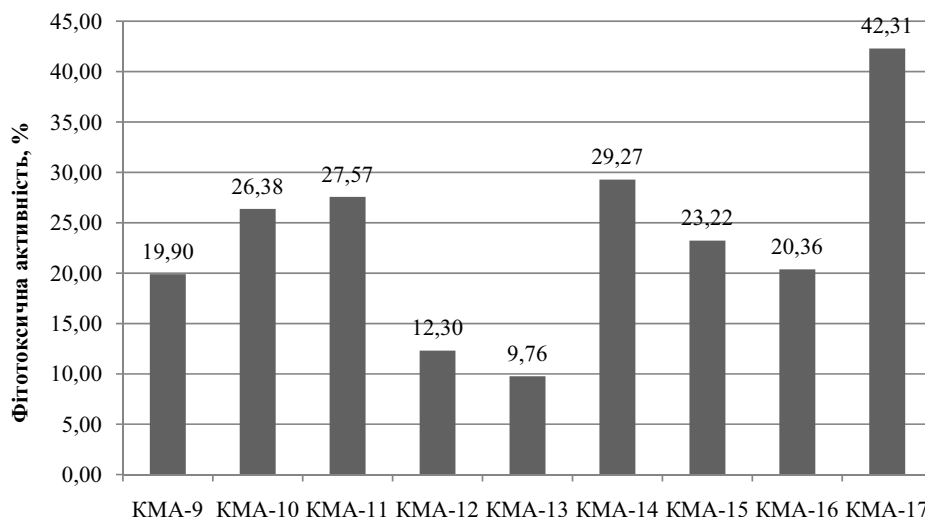


Рис. 2. Фітотоксичність грибів роду *Fusarium* щодо проростків пшениці сорту Тюбалт. КМА-9–КМА-17 – досліджені ізоляти

Фітотоксичність у межах від 20 до 23 % була притаманна метаболітам *Fusarium sp.* КМА-9 (19,9 %), КМА-16 (20,4 %) та КМА-15 (23,2 %). І, нарешті, найнижчу активність щодо проростків пшениці сорту Тюбалт мали метаболіти *Fusarium sp.* КМА-12 і КМА-13. Показники фітотоксичної активності цих культур становили 12,3 та 9,8 % відповідно. Зважаючи на те, що токсичними прийнято вважати штами, метаболіти яких пригнічують ріст більше ніж на 30 % [6], з усіх досліджених культур токсичним можна вважати лише *Fusarium sp.* КМА-17.

Фітотоксична дія метаболітів представників роду *Fusarium* щодо насіння та проростків

озимої пшениці сорту Вдала була неоднорідною і також варіювала залежно від штаму. Насамперед, порівняно з ярою пшеницею сорту Тюбалт ці метаболіти виявляли менш токсичний вплив на сорт Вдала. Окрім того, на відміну від сорту Тюбалт, за впливу метаболітів фузарієвих грибів на насіння цього сорту спостерігали не лише пригнічувальний, а й стимулювальний ефект (рис. 3).

Встановлено, що лише у *Fusarium sp.* КМА-11 показник фітотоксичної активності сягав 25,8 %, тому його віднесли до помірно токсичних. Частина штамів мала слабку (*Fusarium sp.* КМА-10, ФА = 17,6 % і *Fusarium sp.* КМА-13, ФА = 13,4 %)

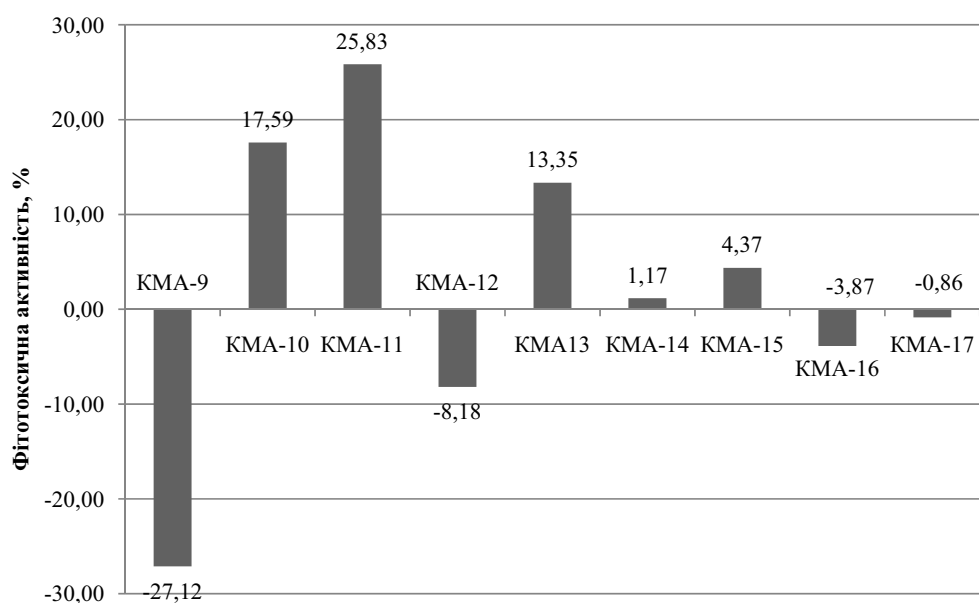


Рис. 3. Фітотоксичність грибів роду *Fusarium* щодо проростків пшениці сорту Вдала. КМА-9–КМА-17 – досліджені ізоляти

чи дуже слабку (*Fusarium sp.* КМА-15, ФА = 4,4 %) фітотоксичність. Натомість метаболіти інших культур грибів або не здійснювали достовірного впливу (*Fusarium sp.* КМА-14, ФА = 1,2 % і *Fusarium sp.* КМА-17, ФА = -0,9 %) порівняно з контролем, або стимулювали розвиток проростків у різному ступені (рис. 3). Зокрема, метаболіти штамів *Fusarium sp.* КМА-12 і КМА-16 виявляли слабкий стимулювальний ефект щодо проростків сорту Вдала (ФА = -8,2 та -3,9 %, відповідно). Найвищу стимулювальну активність було встановлено для метаболітів *Fusarium sp.* КМА-9, показник фітотоксичної активності якого становив -27,1 %. Отримані нами дані стосовно фітотоксичної активності метаболітів досліджених культур грибів узгоджуються з результатами інших авторів [18], відповідно до яких представники роду *Fusarium* можуть або стимулювати розвиток наземної частини проростків пшениці, або не справляти помітного впливу, або ж пригнічувати розвиток рослин.

Зважаючи на те, що спеціалізація фітопатогенних мікроміцетів може бути різною, зокрема широкою чи вузькою, видовою чи сортовою тощо, порівнювали активність метаболітів досліджених грибів щодо обох сортів пшениці. Порівняльний аналіз фітотоксичної активності метаболітів грибів дав змогу з'ясувати, що вона була неоднорідною (рис. 4), тобто в досліджених культур грибів спостерігали певну сортову спеціалізацію.

Характер впливу на проростки насіння обох сортів серед досліджених культур збігався лише у п'яти з дев'яти культур (рис. 4). Зокрема, у *Fusarium sp.* КМА-11 показники фітотоксичності практично не відрізнялися за впливу на обидва

сорта (ФА = 25,6 та 25,8 % для сортів Тюбалт і Вдала, відповідно). У *Fusarium sp.* КМА-10 фітотоксична активність щодо сорту Вдала була в півтора раза нижчою (ФА = 17,6 %) порівняно із сортом Тюбалт (ФА = 26,4 %), натомість у *Fusarium sp.* КМА-13, навпаки, вищою і становила для сорту Вдала 13,4 % і сорту Тюбалт – 9,8 %.

Порівняно з описаними штамми, у ізолятах *Fusarium sp.* КМА-14 та КМА-15 було виявлено більш суттєву різницю фітотоксичності залежно від сорту рослин. Наприклад, якщо за дії метаболітів на сорт Тюбалт штам КМА-14 був віднесений до помірно токсичних, зважаючи на те, що показник його фітотоксичної активності становив 29,3 %, то у сорту Вдала такого ефекту практично не було (ФА = 1,2 %). Подібне явище було зафіксовано і для *Fusarium sp.* КМА-15. Метаболіти цієї культури також виявляли більшу токсичність щодо сорту Тюбалт (ФА = 23,2 %) порівняно із сортом Вдала (ФА = 4,4 %).

У решти культур грибів спостерігали більш виражену сортову спеціалізацію. *Fusarium sp.* КМА-17, визнаний токсичним на підставі активності його метаболітів на сорт Тюбалт (ФА = 42,3 %), не лише не впливав згубно на сорт Вдала, а й виявляв неістотну стимулювальну активність (ФА = -0,9 %). Крім цієї культури, стимулювальний ефект різного ступеня прояву щодо сорту Вдала було виявлено також у метаболітів штамів *Fusarium sp.* КМА-9, КМА-12 і КМА-16. Причому у *Fusarium sp.* КМА-9 цей вплив був не лише найвищим серед усіх досліджених ізолятів (рис. 3), але й діаметрально протилежним порівняно із сортом Тюбалт.

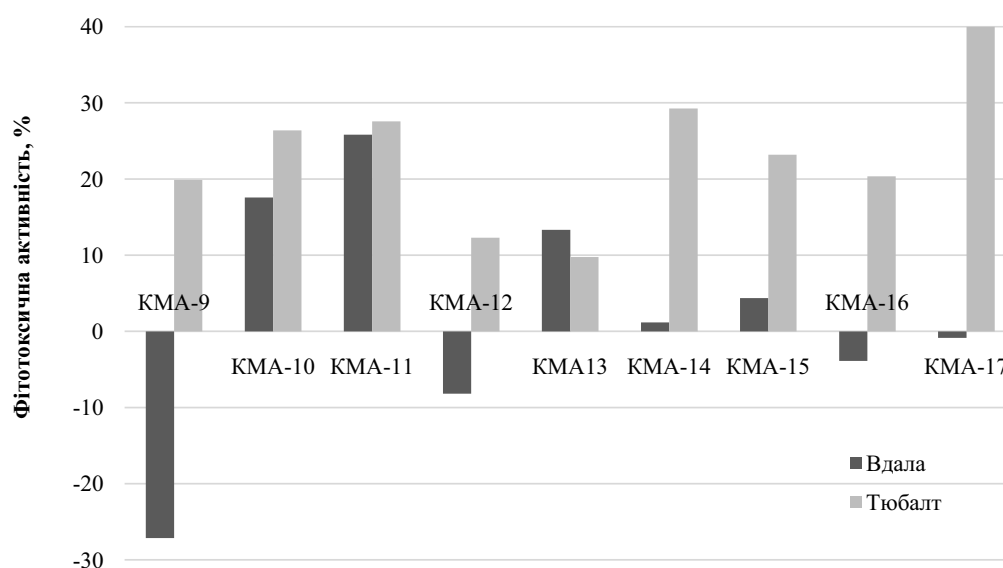
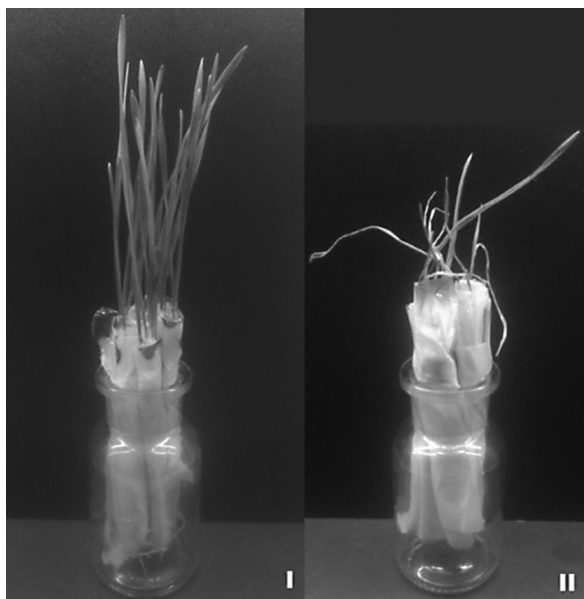


Рис. 4. Порівняльний аналіз фітотоксичності досліджених представників роду *Fusarium* щодо сортів пшениці ярої Тюбалт та озимої Вдала. КМА-9–КМА-17 – досліджені ізоляти

Порівняно з двома описаними вище культурами, *Fusarium sp.* КМА-12 та КМА-16, відповідно до їхнього впливу на обидва сорти пшениці, займали проміжне положення. Тобто щодо сорту Тюбалт вони виявляли слабку токсичну дію і навпаки – незначну стимулювальну активність стосовно сорту Вдала (рис. 3).

Статистичне оброблення отриманих результатів засвідчило, що з упевненістю про вплив метаболітів на проростання насіння можна говорити стосовно сорту Тюбалт ( $p = 0,01$ ). За непараметричним критерієм Даннета різницю довжини коренів між контрольною групою та проростками



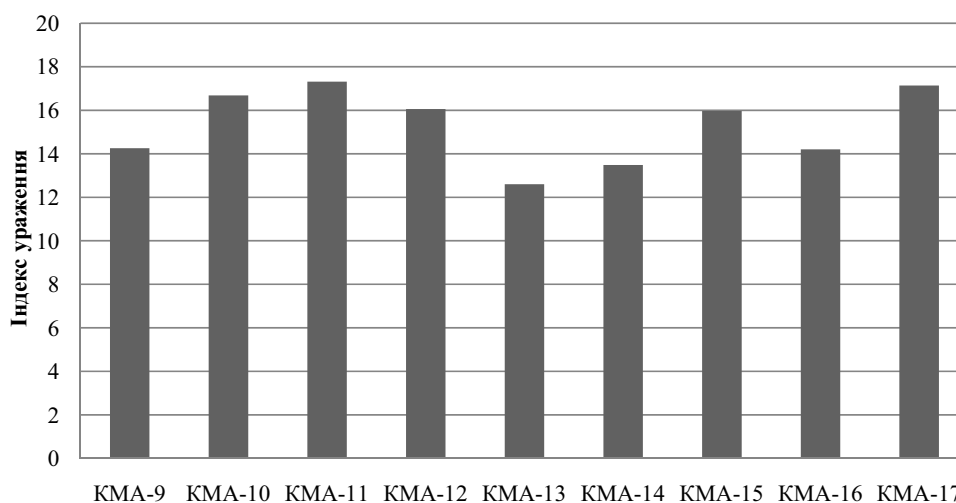
**Рис. 5.** Вплив *Fusarium sp.* КМА-11 на ріст проростків пшениці м'якої: I – інтактні проростки; II – проростки, інокульовані ізолятом

сорту не вдалося зафіксувати на рівні значущості  $p = 0,01$ , хоча вона була наявна на рівні  $p = 0,05$ . Тому для остаточного підтвердження впливу фітотоксинів на насіння сорту Вдала потрібні подальші дослідження.

Патогенність мікроміцетів поєднує не лише якісні, а й кількісні показники. Агресивність грибів щодо рослин, які вони здатні уражувати, є однією з таких кількісних характеристик, що враховуються під час визначення ступеня патогенності окремих культур [6]. Вона може вказувати на здатність фітопатогенів спричинити масові захворювання у рослин і залежить від багатьох чинників (інтенсивність споруляції, життєздатність спор, тривалість інкубаційного періоду захворювання і циклу розвитку грибів, швидкість росту міцелію тощо) [19]. Зважаючи на те, що агресивність є однією з ключових характеристик фітопатогенів, у роботі ми також вивчали цю ознаку в досліджених культур.

У результаті було з'ясовано, що всі культури грибів були здатні спричинити патологічні зміни в рослин, зокрема побуріння пагонів і корінців проростків, затримку росту та в'янення (рис. 5). Однак під час розрахунку індексу ураження рослин значної різниці між значеннями цього показника в різних штамів не спостерігали. Серед досліджених культур найбільш агресивними виявилися *Fusarium sp.* КМА-11 і КМА-17, індекси ураження яких становили 17,3 і 17,1 відповідно (рис. 6).

Найнижчий ступінь агресивності зареєстровано у *Fusarium sp.* КМА-13, індекс ураження у якого становив 12,6. Решта культур мала проміжні значення індексу ураження від 13,5 до 16,2 (рис. 6). Визначення індексів ураження культур грибів дало змогу встановити, що досліджені



**Рис. 6.** Ступінь ураження проростків пшениці м'якої за впливу грибів роду *Fusarium*. КМА-9–КМА-17 – досліджені ізоляти

ізоляти мали середній ступінь агресивності, на підставі чого їх було зараховано до другої групи патогенності [6].

Однією з основних проблем під час розвитку фузаріозів є здатність грибів роду *Fusarium* синтезувати мікотоксини, які можуть накопичуватися в ґрунті, насінні, рослинних рештках і потрапляти в організм людини та тварин. Найбільш небезпечними для здоров'я є токсини, що надходять в організм з продуктами харчування, оскільки залишаються там навіть після термічної обробки [20]. Зважаючи на це, важливим є не лише дослідження фітопатогенних характеристик представників роду *Fusarium*, а й контроль за їхньою здатністю до синтезу мікотоксинів. Тому в роботі не тільки характеризували патогенні і фітотоксичні властивості штамів роду *Fusarium*, виділених із пшениці озимої, але й з'ясували наявність у їхньому геномі генів, продукти яких у цих грибів відповідають за синтез зеараленону. Детальне вивчення шляхів біосинтезу токсину різними авторами засвідчує, що у фузарієвих грибів наявні 4 гени, продукти яких необхідні для його синтезу. За синтез полікетидних синтаз, ферментів, що залучені до біосинтезу зеараленону, відповідають гени *PKS4* і *PKS13*. Зокрема, ген *PKS13* (*ZE1*) кодує один із ключових ензимів біосинтезу зеараленону [21]. Зважаючи на це, для з'ясування потенційної здатності штамів *Fusarium sp.* до синтезу зеараленону проводили ПЛР з праймерами до *PSK13* з подальшою візуалізацією продукту за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Під час аналізу ми використали праймери, запропоновані Ргіуанка та співавторами [11], оскільки, на переконання авторів, вони мають високу

специфічність та ефективність. Для виділення ДНК грибів ми застосували ЦТАБ-метод, рекомендований у роботі [10]. Отримані зразки ДНК, виділеної з міцелію штамів *Fusarium sp.*, були високоякісними, з мінімальною кількістю білкових домішок та мали достатньо високу концентрацію, прийнятну для проведення ПЛР. На підставі цих даних ми, як і інші автори, також рекомендуємо ЦТАБ-метод виділення ДНК для роботи з фузарієвими грибами. У результаті проведеного нами аналізу в жодного з досліджених штамів *Fusarium sp.* гена *PSK13* виявлено не було (рис. 7).

Отже, у результаті проведених досліджень було з'ясовано, що досліджені культури грибів мають фітотоксичну активність різноспрямованого характеру, оскільки вони відрізняються між собою за ступенем і спектром фітотоксичної активності. З огляду на те, що токсичними вважаються ізоляти, які пригнічують ріст рослин більше ніж на 30 %, *Fusarium sp.* КМА-17 можна вважати токсичним щодо насіння сорту Тюбалт, оскільки його фітотоксична активність сягала 42 %. Більшість досліджених культур зараховано до помірно токсичних (*Fusarium sp.* КМА-10, КМА-11, КМА-14, КМА-15) та слаботоксичних (*Fusarium sp.* КМА-9, КМА-12, КМА-13), бо їхня фітотоксична активність не перевищувала 30 %. У пшениці озимої сорту Вдала, навпаки, деякі з них (*Fusarium sp.* КМА-9, КМА-12, КМА-16) стимулювали розвиток проростків. На підставі визначення фітотоксичного профілю досліджених штамів встановлено їхню сортову спеціалізацію. Метаболіти більшості культур виявляють вищу фітотоксичну дію щодо насіння

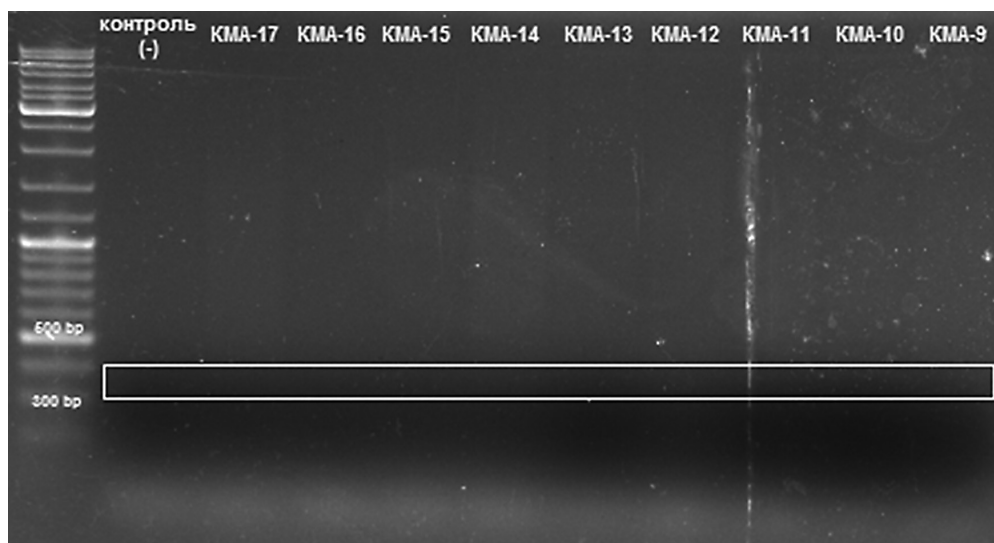


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *PSK13* досліджених ізолятів роду *Fusarium*. КМА-9–КМА-17 – досліджені ізоляти

сорту пшениці ярої Тюбалт порівняно з сортом пшениці озимої Вдала. Усі досліджені штами здатні спричиняти різноманітні патологічні зміни в піддослідних рослин (побуріння пагонів і корінців проростків, затримку росту, в'янення). Відповідно до показників індексу ураження

їх було зараховано до другої групи патогенності – середньоагресивних фітопатогенів. Зважаючи на негативний результат ПЛР щодо наявності гена *PSK13*, ми вважаємо, що досліджені культури не виявляють здатності до синтезу зearаленону.

#### Список літератури

- Baliukoniene V, Bakutis B, Stankevicius H. Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Ann Agric Environ Med.* 2003;10(2):223–7.
- Grumezescu A, Holban A-M, editors. *Foodborne Diseases. Elsevier Inc.*; 2018. Chapter 9, Food-Borne Mycotoxicoses : Pathologies and Public Health Impact; p. 239–74.
- Гагкаева ТЮ, Гаврилова ОП, Левитин ММ. Биоразнообразие и ареалы основных токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium*. *Биосфера.* 2014;6(1):36–45.
- Благініна АА. Оцінка сортів пшениці за впливом на накоплення інфекційних структур грибів роду *Fusarium*. *Агрономія.* 2013;5(3–4):85–90.
- Парфенюк АІ, Безноска ІВ. Інтенсивність спорування фітопатогенних грибів на сортах та гібридах перцю солодкового. *Вісник Харківського національного аграрного університету.* 2012;3:104–8.
- Парфенюк АІ, Благініна АА, Горган ТМ, та ін. Екологічне оцінювання сортів пшениці за впливом на формування популяцій фітопатогенних грибів: метод. рек. Київ; 2014. 39 с.
- Фуртат ІМ, Данышина АО. Біологічні особливості ізолятів роду *Fusarium*, виділених із зерна *Triticum aestivum* L., за культивування на середовищах різного складу. *Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія.* 2019;2:40–8. DOI: 10.18523/2617-4529.2019.2.40-48
- Парфенюк АІ, Горган ТМ, Сагановська ВІ, Горган НА, винахідники; Інститут агроекології і природокористування УААН, патенто власник. Спосіб визначення впливу летких фракцій фітонцидів сортів цибулевих культур на спори мікроміцетів. Пат. 92066 Україна, МПК С12Q 1/00 (2014.01). № u 2014 02417; заявл. 11.03.2014; опубл. 25.07.2014, Бюл. № 14.
- Фуртат ІМ, Остапюк НА, Жукова КО. Видовий склад і біологічні особливості представників роду *Fusarium*, виділених із зерна *Triticum aestivum* L. *Наукові записки НаУКМА. Біологія і екологія.* 2018;1:21–7. DOI: 10.18523/2617-4529.2018.1-27
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual.* First edit. Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2006. 388 p.
- Priyanka SR, Venkataramana M, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of major mycotoxigenic fungi from cereals. *J. Food Sci Technol.* 2015;52(1):486–92.
- Meng K, Wang Y, Yang P, Luo H, Bai Y, Shi P, et al. Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene *PKS4*. *Food Control.* 2010;21(2):207–11.
- Bates ST, Garcia-Pichel F. A culture-independent study of free-living fungi in biological soil crusts of the Colorado Plateau: their diversity and relative contribution to microbial biomass. *PCR amplification of fungal rRNA genes Environ. Microbiol.* 2009;11:56–67. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01738.x
- Glantz SA. *Primer of Biostatistics.* 7th ed. The McGraw-Hill Companies; 2012. 327 p.
- Атраментова ЛА, Утевская ОМ. Статистические методы в биологии: учебник. Горловка: Ліхтар; 2008. 248 с.
- Brown DW, Proctor RH, editors. *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology.* Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2013. Chapter 1, An Overview of *Fusarium*; p. 1–10.
- Ramanathan G, Mahalakshmi N, Shiny ER, Suresh JI. Original Research Article Evaluation of Phytotoxic and Bioactive Potential of Paclitaxel from *Fusarium solani*. 2015;4(3):64–74.
- Литовка ЮА, Савицкая АГ, Рязанова ТВ. Видовой состав и фитотоксичные свойства микромицетов рода *Fusarium*, распространенных в лесных питомниках Средней и Южной Сибири. *Хвойные бореальной зоны.* 2011;XXIX(3-4):232–6.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology.* 2009;58 (3):409–24. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x
- Shukla A. K. Mycotoxins contamination in Animal food and feed. *International Journal of Science and Research.* 2015;4(5):712–6.
- Desjardins AE, Proctor RH. *Molecular biology of Fusarium mycotoxins.* International Journal of Food Microbiology. 2007;119:47–50.

#### References

- Baliukoniene V, Bakutis B, Stankevicius H. Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Ann Agric Environ Med.* 2003;10(2):223–7.
- Grumezescu A, Holban A-M, editors. *Foodborne Diseases. Elsevier Inc.*; 2018. Chapter 9, Food-Borne Mycotoxicoses : Pathologies and Public Health Impact; p. 239–74.
- Gagkaeva TYu, GavriloVA OP, Levitin MM. Biodiversity and distribution of the main toxigenic *Fusarium* fungi. *Biosphere.* 2014;6(1):36–45. Russian.
- Blaginina A. Influence of wheat varieties on accumulation of infectional structure of *Fusarium* fungi. *Biological Resources and Nature Management.* 2013;5(3–4):85–90. Ukrainian.
- Parfenyuk AI, Beznosko IV. The intensity of sporulation in fitopathogenical fungus varieties and hybrids of sweet pepper. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu. Biology.* 2012;3(27):104–8. Ukrainian.
- Parfenyuk AI, Blaginina AA, Gorgan TM, et al. Ecological evaluation of wheat varieties by influence on the formation of populations of phytopathogenic fungi: guidelines. Kyiv; 2014. 39 p. Ukrainian.
- Furtat I, Danshyna A. Biological characteristics of *Fusarium* isolates, received from *Triticum aestivum* L. grains, during cultivation in different media. *NaUKMA Research Papers. Biology and Ecology.* 2019;2:40–8. DOI: 10.18523/2617-4529.2019.2.40-48. Ukrainian.
- Parfenyuk AI, Gorgan TM, Saganovsky VI, Gorgan NA, inventors; Institute of Agroecology and Natural Resources of UAAS, patent holder. Method of determining the influence of volatile fractions of phytoncides of varieties of onion cultures on spores of micromycetes. Patent № 92066. July 25, 2014. Ukrainian.
- Furtat I, Ostapiuk N, Zhukova K. Species and biological features of *Fusarium* genus received from the grain of *Triticum aestivum* L. *NaUKMA Research Papers. Biology and Ecology.* 2018;1:21–7. DOI: 10.18523/2617-4529.2018.1-27. Ukrainian.
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual.* First edit. Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2006. 388 p.
- Priyanka SR, Venkataramana M, Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of major mycotoxigenic fungi from cereals. *J. Food Sci Technol.* 2015;52(1):486–92.



12. Meng K, Wang Y, Yang P, Luo H, Bai Y, Shi P, et al. Rapid detection and quantification of zearalenone-producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene *PKS4*. *Food Control*. 2010;21(2):207–11.
13. Bates ST, Garcia-Pichel F. A culture-independent study of free-living fungi in biological soil crusts of the Colorado Plateau: their diversity and relative contribution to microbial biomass. PCR amplification of fungal rRNA genes *Environ. Microbiol.* 2009;11:56–67. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01738.x
14. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 7th ed. The McGraw-Hill Companies; 2012. 327 p.
15. Atramentova LA, Utevskaia OM. *Statistical Methods in Biology*. Horlovska: Likhtar; 2008. 248 p. Russian.
16. Brown DW, Proctor RH, editors. *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2013. Chapter 1, An Overview of *Fusarium*; p. 1–10.
17. Ramanathan G, Mahalakshmi N, Shiny ER, Suresh JI. Original Research Article Evaluation of Phytotoxic and Bioactive Potential of Paclitaxel from *Fusarium solani*. 2015;4(3):64–74.
18. Litovka YA, Savitskaya AG, Ryazanova TV. Species composition and phytotoxic properties of micromycetes of the genus *Fusarium*, common forest nurseries of Central and Southern Siberia. *Khvoynyye borealnoy zony*. 2011;XXIX(3-4):232–6. Russian.
19. Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*. 2009;58(3):409–24. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x
20. Shukla AK. Mycotoxins contamination in Animal food and feed. *International Journal of Science and Research*. 2015;4(5):712–6.
21. Desjardins AE, Proctor RH. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;119:47–50.

I. Furtat, A. Danshyna, O. Mankovska

### PHYTOPATHOGENIC AND TOXIGENIC CHARACTERISTICS OF *FUSARIUM* ISOLATES, RECEIVED FROM *TRITICUM AESTIVUM* L. GRAINS

**Aim.** The main purpose of the research was to examine distinct phytopathogenic and toxigenic properties of *Fusarium* isolates received from *Triticum aestivum* L. grains and to find out their toxicity.

**Methods.** In this paper, the phytotoxic activity and the aggressiveness of the investigated isolates were defined in order to characterize their phytopathogenicity. In order to determine the possibility of the isolates to synthesize zearalenone, the PCR analysis was used to detect the presence of polyketide synthase gene *PKS13*, which is important for zearalenone biosynthesis.

**Results.** Most of the investigated isolates were characterized by a moderate level of phytotoxic activity, with only one isolate *Fusarium sp.* KMA-17 being classified as toxic. Based on the analysis of the phytotoxic profile of the studied fungi cultures, their varietal specialization was established: the spring wheat Tyubalt variety was more susceptible to the phytotoxic effect compared to the winter Wdala variety. Surprisingly, metabolites from some of the isolates were observed to stimulate growth of the Wdala variety seedlings. All of the received fungi isolates caused pathological changes in the experimental plants, including tissue necrosis of shoots and roots of seedlings, retardation of growth and wilting. The studied cultures were characterized by a moderate degree of aggressiveness and were assigned to the second pathogenicity group. PCR study did not reveal the *PKS13* gene in genomes of the isolates, which implies the impossibility of synthesizing zearalenone.

**Conclusions.** To sum up, the received *Fusarium sp.* isolates were characterized by moderate phytotoxicity and aggressiveness and did not show any ability to synthesize zearalenone. Taking the complex of investigated features into account the *Fusarium sp.* isolates can be considered non-toxic.

**Keywords:** phytopathogenic fungi, phytotoxicity, aggressiveness, toxicity, zearalenone, *Fusarium*.

Матеріал надійшов 29.04.2020