

УДК 577.3

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧИЙ В ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИКАХ ПАТОГЕННЫХ И НЕПАТОГЕННЫХ ВИДОВ И ШТАММОВ ГРИБОВ

Матвеева Татьяна Александровна,

младший научный сотрудник, Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

matveevata@kapella.gpi.ru

Аннотация

Своевременное выявление патогенных видов грибов в сельскохозяйственной отрасли, на технологических производствах, для целей экологического мониторинга и в медицине, безусловно, является актуальной и важной задачей для экономической безопасности и здравоохранения. В статье анализируются возможности флуоресцентной спектроскопии для анализа различий оптических свойств между непатогенными и патогенными грибами. На основе полученных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции были выделены три спектральные области, обладающие потенциалом для различения непатогенных и патогенных групп грибов (эмиссия, нм/возбуждение, нм): 325-375/275-300, 375-500/325-375 и 325-375/275-300. Данные комбинации длин волн возбуждения и эмиссии флуоресценции могут быть использованы для создания устройств для обнаружения патогенных грибов на различных субстратах.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции, оптические характеристики грибов, разделение непатогенных и патогенных грибов.

FLUORESCENCE SPECTROSCOPY TO IDENTIFY DIFFERENCES IN OPTICAL CHARACTERISTICS OF PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC FUNGAL SPECIES AND STRAINS

Tatyana A. Matveeva,

Junior Researcher, Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences

matveevata@kapella.gpi.ru

ABSTRACT

The timely detection of pathogenic fungi in the agricultural sector, in technological production, for environmental monitoring purposes, and in medicine is undoubtedly an actual and important task for economic security and public health. This article analyzes the potential of fluorescence spectroscopy for analyzing differences in optical properties between nonpathogenic and pathogenic fungi. Based on the obtained fluorescence excitation-emission matrices, three

spectral regions with the potential to distinguish between nonpathogenic and pathogenic fungal groups were identified (emission, nm/excitation, nm): 325-375/275-300, 375-500/325-375, and 325-375/275-300. These combinations of fluorescence excitation and emission wavelengths can be used to create devices for detecting pathogenic fungi on various substrates.

Keywords: fluorescence spectroscopy, excitation-emission matrices (EEM), optical characteristics of fungi, separation of non-pathogenic and pathogenic fungi.

Введение. Быстрый мониторинг болезней растений в режиме реального времени, на ранних стадиях является актуальной и важной проблемой продовольственной безопасности: патогены могут уничтожать урожай, а также синтезировать широкий спектр токсинов, опасных для животных и человека [1].

Различные оптические методы широко используются в сельском хозяйстве. В отличие от канонических обычных лабораторных методов, таких как ПЦР, ИФА и т.д., оптические методы анализа неинвазивны, быстры, просты, имеют относительно низкую стоимость, позволяют быстро проводить анализ и получать результаты. Среди оптических методов наиболее распространены спектроскопия отражения в видимой и ИК области [2, 3], спектроскопия комбинационного рассеяния, гиперспектральная визуализация, временно разрешенная терагерцовая спектроскопия и методы, основанные на явлении флуоресценции [4]. Примерами применения оптических методов для диагностики заражения грибковыми заболеваниями являются ИК-спектроскопия [5] и спектроскопия комбинационного рассеяния [6, 7].

Методы, основанные на флуоресценции, широко применяются при исследовании биологических объектов. Они сочетают в себе быстрое получение данных, высокую чувствительность и специфичность, простоту подготовки образцов, относительно низкую стоимость. Флуоресцентные молекулы обладают большим потенциалом для изучения роста и развития грибов, обнаружения грибковых заболеваний, входя в состав грибов, а также экспрессируясь наружу [8]. Грибы производят большой набор флуоресцентных метаболитов, включая белки, коферменты, витамины, токсины и пигменты, такие как каротиноиды, меланины, флавоноиды и хиноны [9], а также другие вторичные метаболиты [10, 11].

Цель данного исследования – с помощью флуоресцентной спектроскопии выявить различия в оптических характеристиках патогенных и непатогенных видов и штаммов грибов.

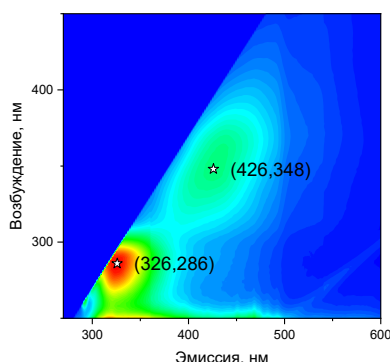
Материалы и методы исследования

Культуры грибов. В исследовании были использованы девять культур грибов, патогенных и непатогенных. Непатогенные грибы были представлены четырьмя представителями Аскомицетов, сумчатых грибов – двумя грибами рода *Penicillium*: *Penicillium candidum* и *Penicillium roqueforti* и двумя Сахаромицетами: *Geotrichum candidum* и *Saccharomyces cerevisiae*. Это культурные штаммы грибов, широко используемые в производстве продуктов питания. В качестве патогенных **Ошибка! Источник ссылки не найден.** были взяты пять грибков-паразитов растений – четыре Аскомицета: Плеоспоралиевые *Alternaria radicina*, *Bipolaris sorokiniana* и *Phoma epicoccina* и Гипокрейный вид *Fusarium graminearum*, а также один представитель Базидиомицет, базидиальных грибов *Rhizoctonia cerealis*. В качестве возможных различий между штаммами исследовали матрицы возбуждения-эмиссии для штаммов *Fusarium graminearum* FG-30 и FG-33. Для сравнения с другими родами и видами грибов использовали штамм FG-30.

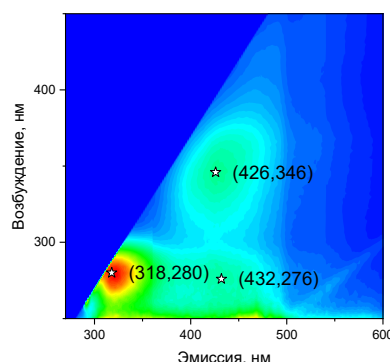
Флуоресценция. Для спектроскопических исследований использовали – в случае непатогенных грибов – лиофилизированные культуры, для патогенных грибов – культуры, выращенные на агаре. Для измерения флуоресценции использовали спектрофлуориметр Jasco FP-8300. Лиофилизированный порошок засыпали в кювету для твердых образцов, либо, во втором варианте, в кювету помещали фрагмент культуры гриба вместе со средой. Делались три независимых измерения разных образцов. Поскольку грибы имели разную интенсивность флуоресценции, измерения проводили с разными настройками спектрофлуориметра. Для сравнения, матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции нормировались на максимальное значение флуоресценции в области возбуждения: 270–288/эмиссия: 318–326 нм). Максимум флуоресценции в данной области соответствует флуоресценции ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина).

Результаты и их обсуждение

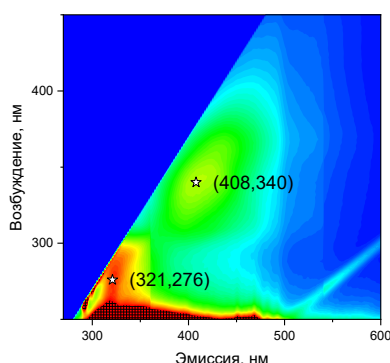
На рисунке 1 представлены усредненные по трем измерениям матрицы возбуждения-эмиссии для каждого исследуемого гриба. Непатогенные виды грибов имеют заметные максимумы не только в области флуоресценции аминокислот, но и в области 400–440/340–350 нм. Для патогенных грибов максимумы в области 400–440/340–350 нм менее выражены. Так же для патогенных грибов выявлена характерная область флуоресценции при возбуждении 250–260 нм с эмиссией в широком диапазоне длин волн 300–500 нм. Интенсивность данной области превышает таковую аминокислотного максимума. Для непатогенных грибов такая область была зафиксирована только для *Geotrichum candidum* (Ошибка! Источник ссылки не найден.).



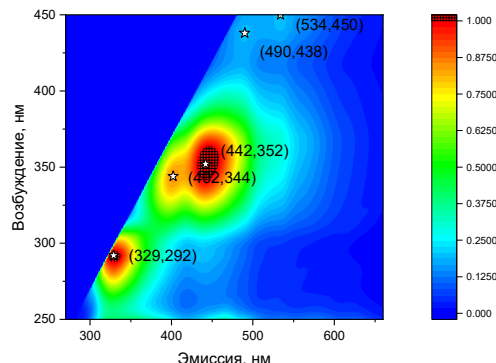
А



Б



В



Г

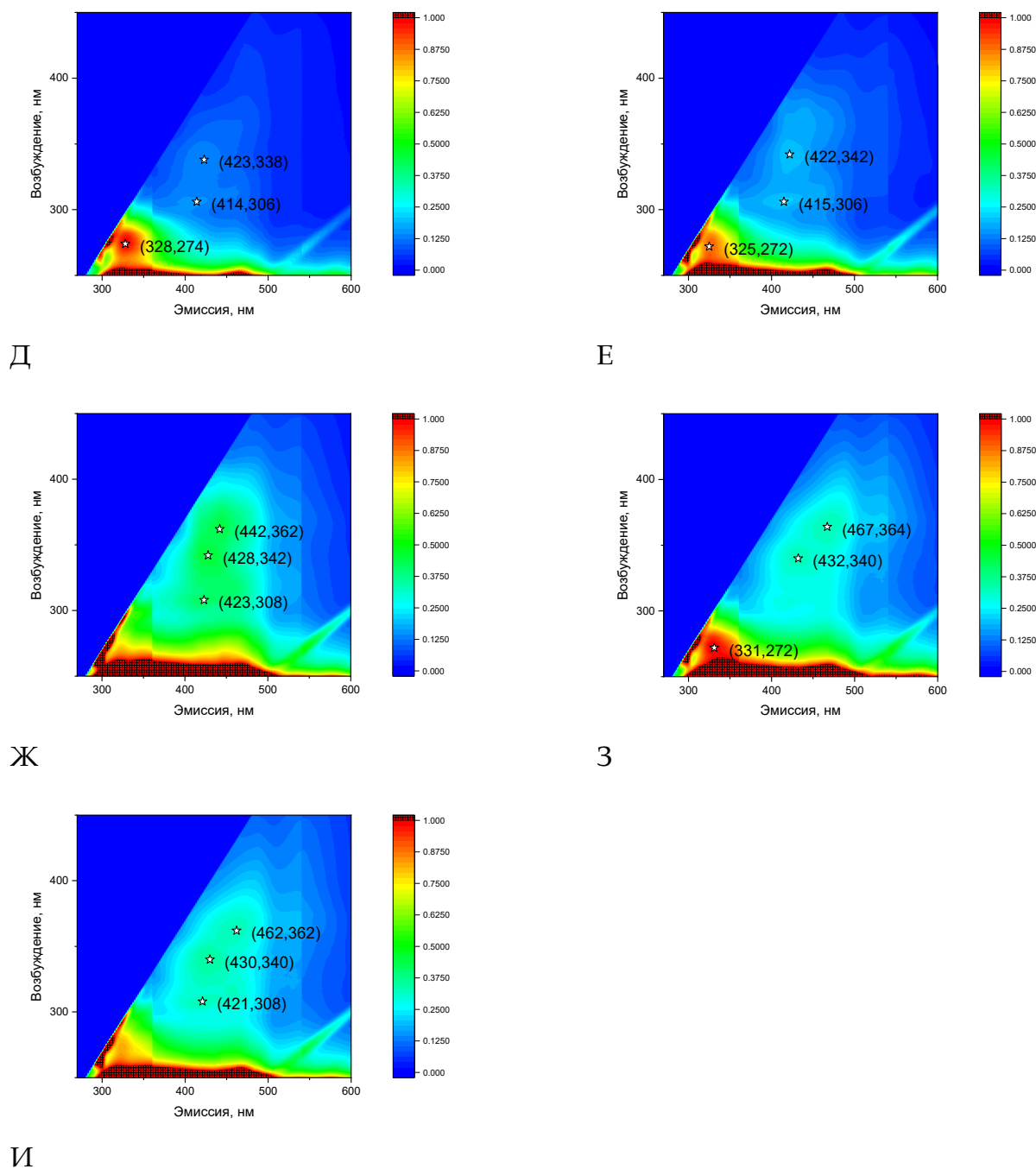
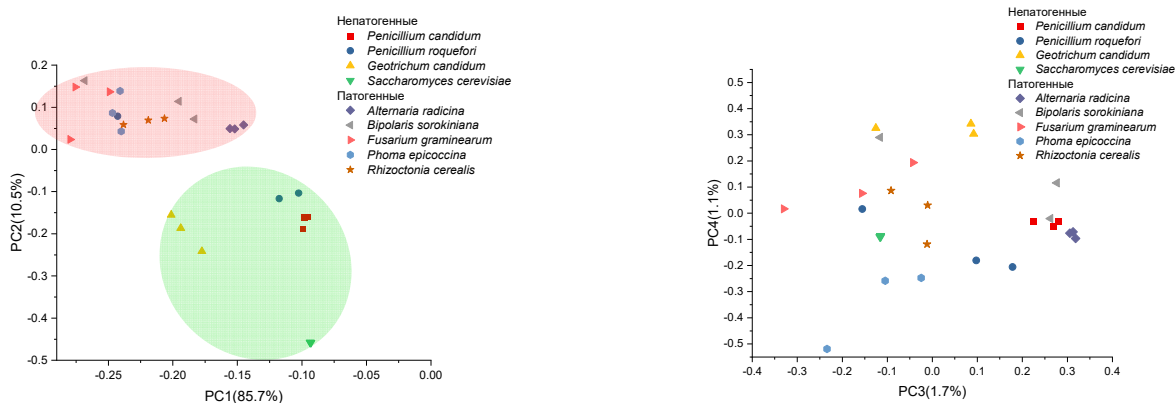


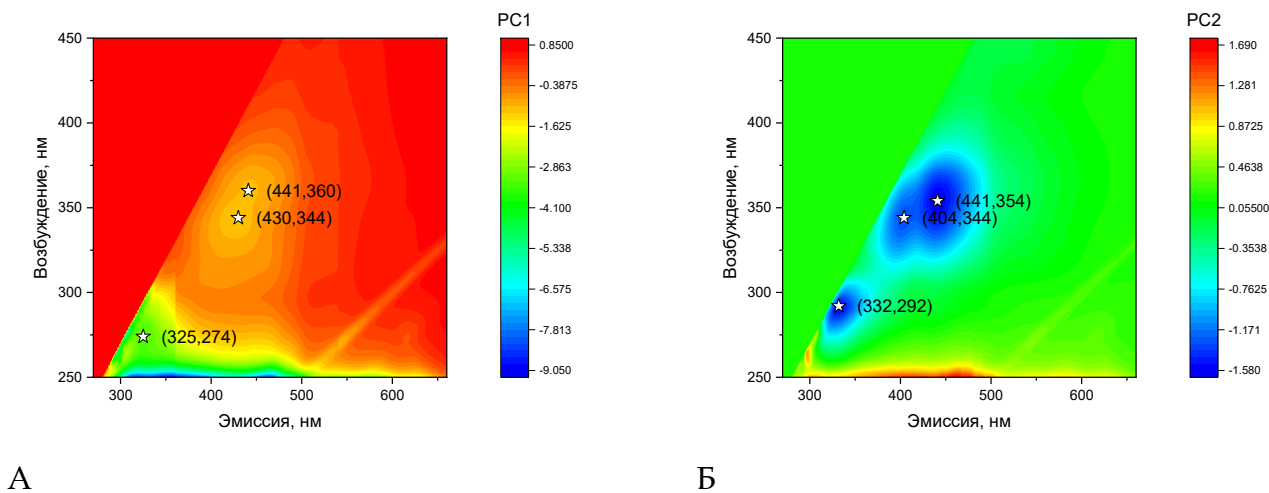
Рисунок 1. Матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции для непатогенных (А - *Penicillium candidum*; Б - *Penicillium roqueforti*; В - *Geotrichum candidum*; Г - *Saccharomyces cerevisiae*) и патогенных (Д - *Alternaria radicina*; Е - *Bipolaris sorokiniana*; Ж - *Fusarium graminearum*; З - *Phoma epicoccina*; И - *Rhizoctonia cerealis*) видов грибов.

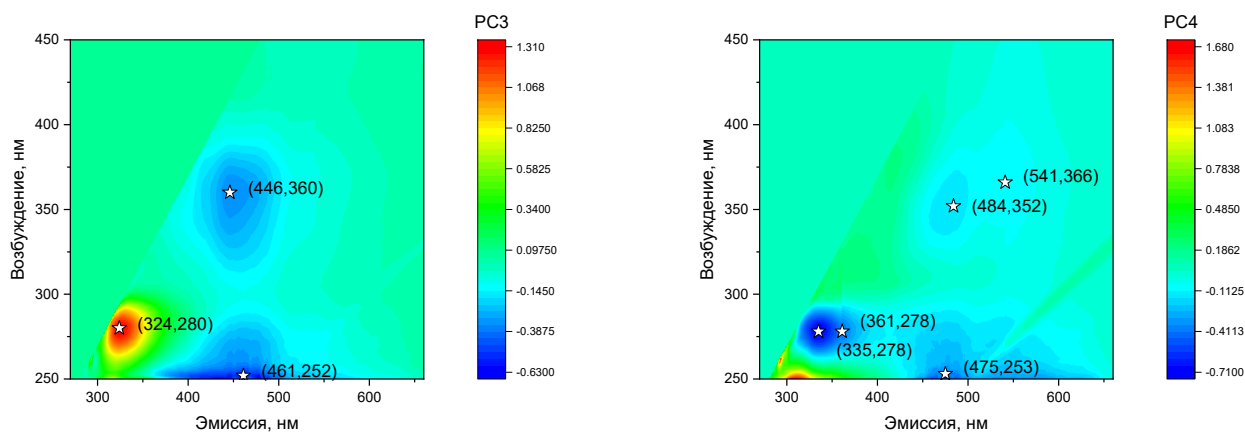
В оптической спектрометрии для разделения близких по виду спектров обычно используют метод главных компонент, результаты которого не только свидетельствуют о возможности разделения исследуемых проб, но и показывают диапазоны длин волн возбуждения и эмиссии, которые ответственны за разделение. На рисунке 2 показаны результаты анализа методом главных компонент (PCA, principal component analysis), на рисунке 3 показаны карты нагрузок (loadings) для каждой из главных компонент. Видно, что патогенные («красное облако») и непатогенные («зелёное облако») грибы хорошо разделяются по второй главной компоненте PC2 (рис. 2 А). Характерно, что данная компонента отвечает за флуоресценцию аминокислот, причем для непатогенных грибов

длины волн возбуждения сдвинуты в длинноволновую область (292 нм, Рисунок Б) по сравнению с патогенными грибами (~272 нм, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Так же большой вклад в разделение по компоненте PC2 вносят максимумы в области 375–500/325–375 нм. В данном диапазоне у грибов могут флуоресцировать большое количество значимых биологических соединений, основные из них: птериридиновые соединения (фолиевая кислота, неоптерин и т.д.); кумарин; хитин; хлорогеновая кислота; NADPH; NADH; целлюлоза; лигнин; липофусцин; алкалоиды; спорополленин; флавоноиды; терпеноиды; микотоксины: дезоксиниваленол, ниваленол, зеараленон и альтернариол; метаболиты (хиноны и др.) [12]. По-видимому, данные соединения более активно представлены в непатогенных грибах. С другой стороны, флуоресценция грибов может меняться на разных жизненных стадиях фазах роста [12], что так же могло сказаться на результатах.



А Б
Рисунок 2. Результаты метода главных компонент, для компонент 1 и 2 (А), для 3 и 4 (Б)



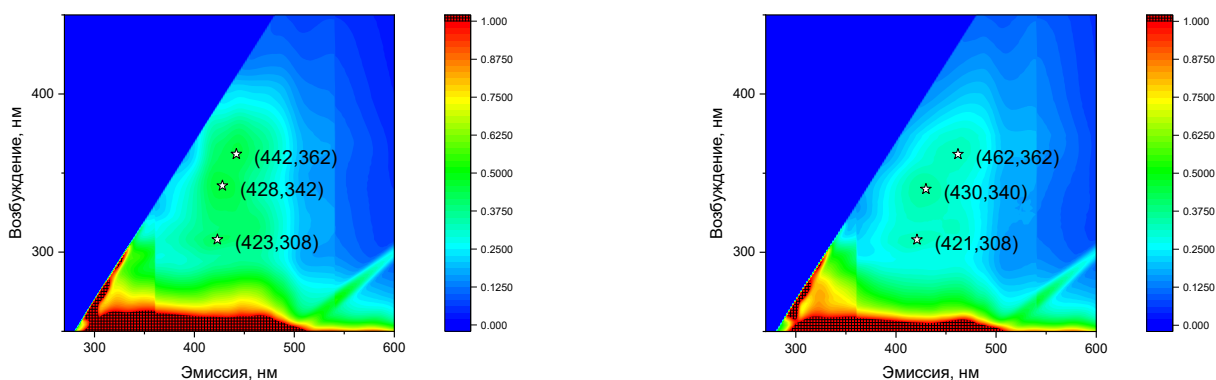


В

Г

Рисунок 3. Нагрузки (loadings) метода главных компонент для PC1 (А), PC2 (Б), PC3 (В), PC4 (Г)

Для исследования возможных различий между штаммами исследовали матрицы возбуждения-эмиссии для штаммов *Fusarium graminearum* FG-30 и FG-33 (рис. 4). Разные штаммы дают практически идентичные матрицы возбуждения-эмиссии, небольшое смещение в длинноволновую область наблюдается для пика $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 462/362$ нм.



А

Б

Рисунок 4. Матрицы возбуждения-эмиссии для штаммов *Fusarium graminearum* FG-30 (А) и FG-33 (Б)

Выводы. В работе с помощью флуоресцентной спектроскопии исследовались различия в оптических характеристиках патогенных и непатогенных видов и штаммов грибов. С помощью матриц возбуждения-эмиссии и метода главных компонент выявлены различия в спектрах флуоресценции некоторых патогенных и непатогенных грибов. Выяснилось, что в матрице возбуждения-эмиссии существует две области, показывающие максимальные различия во флуоресценции патогенных и непатогенных грибов. Это область флуоресценции аминокислот, причем возбуждение у непатогенных грибов сдвинуто в длинноволновую область (292 нм) по сравнению с аминокислотными максимумами патогенных грибов (~272 нм). Наибольший вклад в разделение грибов по флуоресценции вносит область возбуждение:375–500/эмиссия:325–375 нм. Для патогенных видов грибов интенсивность флуоресценции в данной области много меньше максимума интенсивности флуоресценции аминокислот (~20-40%), в то время как для непатогенных грибов интенсивность в данной области изменяется в диапазоне 50%-110% от максимума, представляющего флуоресценцию аминокислот. Указанные области флуоресценции могут использоваться для разделения патогенных и непатогенных грибов, в том числе на различных субстратах, что может быть использовано в сельском хозяйстве и прочих сферах.

Список литературы:

1. Gudkov S., Sarimov R. M., Astashev M. E., Pishchalnikov R. Y., Yanykin D. V., Simakin A. V., Shkirin A. V., Serov D. A., Konchekov E. M., Gusein-zade N. G. Modern physical methods and technologies in agriculture // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk.* – 2024. – Vol. 194, No. 2. P. 208-226.
2. Kremneva O. Y., Danilov R. Y., Sereda I. I., Tutubalina O. V., Pachkin A. A., Zimin M. V. Spectral characteristics of winter wheat varieties depending on the development degree of *Pyrenophora tritici-repentis* // *Precision Agriculture.* – 2023. – Vol. 24, No. 3. P. 830-852.
3. Graeff S., Link J., Claupein W. Identification of powdery mildew (*Erysiphe graminis* sp. *tritici*) and take-all disease (*Gaeumannomyces graminis* sp. *tritici*) in wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of leaf reflectance measurements // *Open Life Sciences.* – 2006. – Vol. 1, No. 2. P. 275-288.
4. Gudkov S. V., Matveeva T. A., Sarimov R. M., Simakin A. V., Stepanova E. V., Moskovskiy M. N., Dorokhov A. S., Izmailov A. Y. Optical Methods for the Detection of Plant Pathogens and Diseases // *Agriengineering.* – 2023. – Vol. 5, No. 4. P. 1789-1812.
5. Pankin D., Povolotckaia A., Borisov E., Povolotskiy A., Borzenko S., Gulyaev A., Gerasimenko S., Dorochoy A., Khamuev V., Moskovskiy M. Investigation of Spectroscopic Peculiarities of Ergot-Infected Winter Wheat Grains // *Foods.* – 2023. – Vol. 12, No. 18. P. 3426.
6. Egging V., Nguyen J., Kurouski D. Detection and identification of fungal infections in intact wheat and sorghum grain using a hand-held Raman spectrometer // *Analytical chemistry.* – 2018. – Vol. 90, No. 14. P. 8616-8621.
7. Moskovskiy M. N., Sibirev A. V., Gulyaev A. A., Gerasimenko S. A., Borzenko S. I., Godyaeva M. M., Noy O. V., Nagaev E. I., Matveeva T. A., Sarimov R. M. Raman spectroscopy enables non-invasive identification of mycotoxins p. *Fusarium* of winter wheat seeds // *Photonics.* – 2021. – Vol. 8, No. 12. P. 587.
8. Knaus H., Blab G. A., Jerre van Veluw G., Gerritsen H. C., Wösten H. A. B. Label-free fluorescence microscopy in fungi // *Fungal Biology Reviews.* – 2013. – Vol. 27, No. 2. P. 60-66.
9. Christiansen J. V., Isbrandt T., Petersen C., Sondergaard T. E., Nielsen M. R., Pedersen T. B., Sørensen J. L., Larsen T. O., Frisvad J. C. Fungal quinones: diversity, producers, and applications of quinones from *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium*, and *Arthrimum* // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2021. – Vol. 105, No. 21-22. P. 8157-8193.
10. Jha Y. Chapter 23 - Differential fungal metabolite accumulation in response to abiotic and biotic stresses // *Fungal Secondary Metabolites* / Abd-Elsalam K. A., Mohamed H. I. Elsevier, 2024. – C. 457-467.
11. Fedoseeva E., Patsaeva S., Stom D., Terekhova V. Excitation-Dependent Fluorescence Helps to Indicate Fungal Contamination of Aquatic Environments and to Differentiate Filamentous Fungi // *Photonics.* – 2022. – Vol. 9, No. 10. P. 692.
12. Matveeva T. A., Sarimov R. M., Persidskaya O. K., Andreevskaya V. M., Semenova N. A., Gudkov S. V. Application of Fluorescence Spectroscopy for Early Detection of Fungal Infection of Winter Wheat Grains // *AgriEngineering.* – 2024. – Vol. 6, No. 3. P. 3137-3158.

References:

1. Gudkov S., Sarimov R. M., Astashev M. E., Pishchalnikov R. Y., Yanykin D. V., Simakin A. V., Shkirin A. V., Serov D. A., Konchekov E. M., Gusein-zade N. G. Modern physical methods and technologies in agriculture // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk.* – 2024. – Vol. 194, No. 2. P. 208-226.
2. Kremneva O. Y., Danilov R. Y., Sereda I. I., Tutubalina O. V., Pachkin A. A., Zimin M. V. Spectral characteristics of winter wheat varieties depending on the development degree of *Pyrenophora tritici-repentis* // *Precision Agriculture.* – 2023. – Vol. 24, No. 3. P. 830-852.
3. Graeff S., Link J., Claupein W. Identification of powdery mildew (*Erysiphe graminis* sp. *tritici*) and take-all disease (*Gaeumannomyces graminis* sp. *tritici*) in wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of leaf reflectance measurements // *Open Life Sciences.* – 2006. – Vol. 1, No. 2. P. 275-288.
4. Gudkov S. V., Matveeva T. A., Sarimov R. M., Simakin A. V., Stepanova E. V., Moskovskiy M. N., Dorokhov A. S., Izmailov A. Y. Optical Methods for the Detection of Plant Pathogens and Diseases // *Agriengineering.* – 2023. – Vol. 5, No. 4. P. 1789-1812.
5. Pankin D., Povolotckaia A., Borisov E., Povolotskiy A., Borzenko S., Gulyaev A., Gerasimenko S., Dorochoy A., Khamuev V., Moskovskiy M. Investigation of Spectroscopic Peculiarities of Ergot-Infected Winter Wheat Grains // *Foods.* – 2023. – Vol. 12, No. 18. P. 3426.
6. Egging V., Nguyen J., Kurouski D. Detection and identification of fungal infections in intact wheat and sorghum grain using a hand-held Raman spectrometer // *Analytical chemistry.* – 2018. – Vol. 90, No. 14. P. 8616-8621.
7. Moskovskiy M. N., Sibirev A. V., Gulyaev A. A., Gerasimenko S. A., Borzenko S. I., Godyaeva M. M., Noy O. V., Nagaev E. I., Matveeva T. A., Sarimov R. M. Raman spectroscopy enables non-invasive identification of mycotoxins p. *Fusarium* of winter wheat seeds // *Photonics.* – 2021. – Vol. 8, No. 12. P. 587.
8. Knaus H., Blab G. A., Jerre van Veluw G., Gerritsen H. C., Wösten H. A. B. Label-free fluorescence microscopy in fungi // *Fungal Biology Reviews.* – 2013. – Vol. 27, No. 2. P. 60-66.
9. Christiansen J. V., Isbrandt T., Petersen C., Sondergaard T. E., Nielsen M. R., Pedersen T. B., Sørensen J. L., Larsen T. O., Frisvad J. C. Fungal quinones: diversity, producers, and applications of quinones from *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium*, and *Arthrimum* // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2021. – Vol. 105, No. 21-22. P. 8157-8193.
10. Jha Y. Chapter 23 - Differential fungal metabolite accumulation in response to abiotic and biotic stresses // *Fungal Secondary Metabolites* / Abd-Elsalam K. A., Mohamed H. I. Elsevier, 2024. – C. 457-467.
11. Fedoseeva E., Patsaeva S., Stom D., Terekhova V. Excitation-Dependent Fluorescence Helps to Indicate Fungal Contamination of Aquatic Environments and to Differentiate Filamentous Fungi // *Photonics.* – 2022. – Vol. 9, No. 10. P. 692.
12. Matveeva T. A., Sarimov R. M., Persidskaya O. K., Andreevskaya V. M., Semenova N. A., Gudkov S. V. Application of Fluorescence Spectroscopy for Early Detection of Fungal Infection of Winter Wheat Grains // *AgriEngineering.* – 2024. – Vol. 6, No. 3. P. 3137-3158.