

ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗОВ НА ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ (×*TRITICOSECALE* WITTM. & A. CAMUS)

А.А. ШВАРЦЕВ^{1, 2}, М.Л. КОНЫШЕВА¹, С.А. САВИНОВА¹,
Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{1, 3}, В.В. ПЫЛЬНЕВ²

(¹ООО «НПФ Синтол»;

(²Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;

³Институт аналитического приборостроения РАН)

Грибные фитопатогены являются одними из самых распространенных и опасных возбудителей болезней растений, заражение которыми приводит к существенным потерям урожая и значительным экономическим затратам. Наибольший ущерб сельскохозяйственным культурам наносят грибы рода Fusarium, что делает изучение их распространения, видового разнообразия и методов диагностики более востребованным с каждым годом. В селекционной работе это изучение имеет особое значение. Определение видового состава данного патогена позволяет не только оценить степень заражения, но и проводить превентивную селекцию на устойчивость к фузариозу. Целью исследований являлась апробация разработанных праймеров и зондов для выявления наиболее распространенных представителей рода Fusarium – таких, как F. culmorum, F. graminearum и F. roae. В качестве материала для исследований использовали образцы чистых культур грибов, полученных из разных коллекций микроорганизмов. Изучалось 35 сортов озимой тритикале из коллекции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Для проведения видовой дифференциации исследуемых видов были сконструированы олигонуклеотиды на фрагмент гена Galactose oxidase (GalOx) и гомологичных ему генов из базы данных NCBI. Диагностика проводилась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Были определены основные аналитические характеристики разработанных праймеров – такие, как специфичность и чувствительность. Скрининг 35 сортов озимой тритикале показал их поражение грибами рода Fusarium. Выявлено, что преобладающим видом является F. roae, который был обнаружен у 95,2% сортов. Для F. graminearum было обнаружено, что наибольшее распространение приходится на период с 2020 по 2021 гг., когда заражение образцов тритикале составило 31,4 и 91,4% соответственно. Наименьшее заражение было видом F. culmorum, который обнаружен только у 20% всех образцов. Дополнительно были обнаружены сорта озимой тритикале урожая 2022 г., которые меньше всего подвержены заражению изучаемыми видами: K-1-19 № 14 K-3851 ПРАГ502 (Дагестан) и K-1-19 № 42 K3727 СНТ-5/92 (Омская обл.).

Ключевые слова: селекция на устойчивость, грибные фитопатогены, Fusarium, ПЦР в реальном времени, диагностика, озимая тритикале, видовое разнообразие, зараженность.

Введение

Фитопатогенные грибы занимают ведущее положение среди микроорганизмов, вызывающих различные заболевания у растений (5). Одними из наиболее опасных и широко распространенных представителей данного царства являются грибы рода *Fusarium* (Link), способные поражать более 200 видов растений [1]. Представители рода способны вызывать различные нарушения роста и развития, поражая как вегетативные, так и генеративные органы, причем заражению подвержены и молодые, и взрослые растения [2]. К характерным признакам развития фузариозов относят

гнили (корней, стеблей и плодов), язвы, пятнистости листьев, но наиболее часто встречаемой формой проявлений заражения является трахеомикозное увядание растений [4, 11, 14]. Среди факторов, способствующих доминированию фузариевых грибов, выделяют минимизацию обработки почвы, ежегодное обильное протравливание семян триазольными препаратами, существенное снижение сопротивляемости почвенной среды к патогену, а также высокий уровень засоренности сорняками [11].

Биологические особенности грибов рода *Fusarium* тесно связаны с условиями их обитания [7]. Представители рода *Fusarium* широко распространены во всем мире, что обусловлено высокой экологической пластичностью ввиду внутривидовой изменчивости [3]. Некоторые виды – такие, как *Fusarium culmorum* (WG Smith), *F. graminearum* (Schwabe) и *F. poae* (Peck) Wollenw, в настоящее время присутствуют на территории всех европейских стран, а также на территории Азии, Америки, Африки и Океании [16, 24]. На территории России представители данного рода встречаются в Центральной и Европейской частях страны, а также в различных частях Сибири (в зонах тайги, подтайги и северной лесостепи), Северном Кавказе, Ставропольском крае [7].

При заражении продовольственного зерна представителями рода *Fusarium* синтезируются микотоксины [6, 10]. Среди таких химических соединений особенно выделяются фумонизин, зеараленон и трихотеценовые микотоксины [9]. Употребление продуктов, содержащих эти вещества, создает угрозу для здоровья человека и животных [8].

Одним из основных продуцентов трихотеценовых микотоксинов считается *F. poae*. Этот вид является одним из основных источников трихотеценов типа А: токсина Т-2 и его основного метаболита НТ-2. Особенностью *F. poae* является то, что в отличие от других возбудителей фузариозов (кроме *Fusarium langsethiae*) он поражает злаки до цветения, а не во время [15, 18] цветения. Патогенность данного вида сильно зависит от температуры и наиболее высока в диапазоне от 15 до 18 °С [12]. Результаты исследований свидетельствуют о широком распространении *F. poae* в образцах зерна из Северной Америки и Европы [19, 21].

При наличии в период вегетации зерновых культур более влажного и теплого климата преобладающим видом может оказаться *F. graminearum*, который способен продуцировать токсины дезоксиниваленол (DON) и зеараленон [13]. Токсины, вырабатываемые *F. culmorum* (в основном DON, NIV и ZEN), оказывают цитотоксическое действие на растения, людей и животных. DON является фактором вирулентности заболевания фузариоза колоса (FHB), приводящим к усиленному росту патогена [20]. Морфологически виды *F. culmorum* и *F. graminearum* очень похожи и вызывают сходные симптомы у злаковых культур, а именно: колос пшеницы приобретает обесцвеченный вид, зерновки окрашиваются в розоватый цвет и становятся сморщенными [16].

Фузариоз зерновых культур является глобальной проблемой, угрожающей производству продуктов питания и продовольственной безопасности [9]. В последние годы изменение климата, технологический прогресс в сельском хозяйстве и импорт семян из отдаленных регионов существенно влияют на видовой состав патогенов.

Определение видового состава патогенов и мониторинг степени зараженности ими сельскохозяйственных культур позволяют проводить превентивную селекцию на устойчивость к фузариозу.

В настоящее время имеется незначительное число исследований по распространению и видовому разнообразию грибов рода *Fusarium* на озимой тритикале несмотря на ежегодное увеличение объемов посевов данной культуры.

Цель исследований: разработка систем праймеров и зондов для проведения видовой дифференциации грибов рода *Fusarium* и скрининг коллекции озимой тритикалы на наличие исследуемых возбудителей.

Материал и методы исследований

Для проведения исследований были использованы образцы культур грибов, полученные из коллекций РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Всероссийской коллекции микроорганизмов, ООО «Синтол», Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт».

Изучалось 35 сортообразцов озимой тритикале, которые выращивались в полевых условиях в 2020–2022 гг. на селекционных посевах кафедры генетики, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Лабораторные исследования проводились на базе ООО «Синтол» и центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ.

Для выделения нуклеиновых кислот из семян озимой тритикале использовали набор реагентов Сорб-ГМО-Б (GM-503–50, ООО «Синтол», Россия). Образцы предварительно измельчали с помощью мельницы Tube Mill 100 control («ИКА», Германия), используя навеску 50 г, последующее выделение набором проводили согласно инструкции производителя.

Для видовой идентификации грибов рода *Fusarium* использовали участок гена, кодирующего Galactose oxidase (*GalOx*) (для *F. graminearum*), и гомологичные участки генов из полных геномов для *F. poae* и *F. culmorum*.

Проведение ПЦР в режиме реального времени осуществляли с использованием 2,5x реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ (M-428, ООО «Синтол», Россия). Набор реагентов включал в себя следующие компоненты: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, $MgCl_2$ и Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами. Итоговые концентрации компонентов реакционной смеси: 2,5мМ $MgCl_2$, 0,25мМ dNTP и 2,5 е.а. ДНК-полимеразы. Дополнительно в каждую реакцию добавляли внутренний положительный контроль для исключения ложноотрицательного результата.

Для увеличения специфичности и чувствительности олигонуклеотидов при разработке старались учитывать следующий параметр: наличие на 3'-конце G или C нуклеотида («GC-зажим»). Для расчета температуры отжига олигонуклеотидов использовали онлайн-приложение Promega Biomath Calculators с вводом дополнительных данных: Step 3 (Enter Values), концентрация $MgCl_2$ 2,5мМ и концентрация ионов натрия/калия – 50мМ. Наличие или отсутствие вторичных структур образуемых праймерами (шпиклек, димеров) проверяли с помощью онлайн-сервисов Thermo Scientific Web Tools (Multiple Primer Analyzer) и Oligo Calculator version 3.24 (Программа для расчета свойств олигонуклеотидов). Для зондов в качестве флуоресцентного красителя использовали FAM (карбоксихлорофлуоресцеин), присоединенный к 5'-концу. В качестве гасителя флуоресценции использовали RTQ1, присоединенный к 3'-концу зонда. Для зондов у внутреннего положительного контроля в качестве красителя использовали R6G или Cy5, присоединенные к 5'-концу, в качестве гасителя – BHQ2, присоединенный к 3'-концу. Финальные концентрации праймеров в реакционной смеси составили 400нМ, а концентрации зондов – 100нМ. Синтез олигонуклеотидов и расходные материалы, в том числе наборы реагентов, были предоставлены компанией ООО «Синтол».

Постановки ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, Франция/США) по следующей программе амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 с; 60°C – 40 с (для этого этапа включено считывание сигнала флуоресценции – 49 циклов). Для олигонуклеотидов, идентифицирующих *F. Graminearum*, температура отжига, совмещенного с элонгацией, была увеличена до 62°C. Для оптимального расчета пороговых циклов все постановки ПЦР-РВ анализировали с использованием регрессионного метода.

За положительный результат принимали образцы, для которых значение порогового цикла было меньше 40.

Аналитическую специфичность разработанных олигонуклеотидов для ПЦР-РВ проверяли на ДНК 66 близкородственных и сопутствующих организмов: *Alternaria tenuissima*; *Aspergillus niger*; *Drechslera avenae*; *Monilinia fructigena*; *Microdochium nivale*; *Botrytis Cinerea*; *Bipolaris sorokiniana*; *Cercospora beticola*; *P. infestans*; *Cladosporium*; *Gibellina cerealis*; *Helminthosporium sativum* (*Bipolaris sorokiniana*); *Phoma betae* (*Neocamarosporium betae*); *Botrytis cinerea*; *Rhizoctonia solani*; *Colletotrichum acutatum*; *Cercospora kikuchii*; *Fusarium avenaceum*; *F. tricinctum*; *F. verticillioides*; *F. tricinctum*; *F. poae*; *F. solani*; *F. oxysporum*; *F. verticillioides*; *F. culmorum*; *F. sibiricum*; *F. merismoides merismoides*; *F. ussurianum*; *F. culmorum*; *F. sporotrichioides*; *F. oxysporum*; *F. avenaceum*; *F. graminearum*; *F. ussurianum*; *F. sambucinum*; *F. sporotrichioides*; *F. sambucinum* var. *Sambucinum*; *F. graminearum*; *F. graminearum*; *F. oxysporum*; *F. poae*; *Phytophthora infestans*; *Tilletia laevis*; *T. caries*; *T. controversa*; *Verticillium dahliae* (Коллекция ООО «Синтол», Россия); F 4705 *Eutypa* sp; F 985 *Phytophthora cactorum*; F 3333 *P. cinnamomi*; F 3619 *Cylindrocarpon destructans* (*Ilyonectria destructans*); F 3622 *C. destructans* (*I. destructans*); F 4589 *C. destructans* (*I. destructans*); F 3623 *C. destructans* (*I. destructans*); F 865 *C. destructans* (*I. destructans*); FW 122 *C. destructans* (*I. destructans*); FW 221 *C. destructans* (*I. destructans*); FW206 *Ilyonectria robusta*; F 942 *Rhizoctonia solani*; F 3334 *Phanerochaete chrysosporium*; F 143 *Fusarium oxysporum*; F 840 *F. oxysporum*; F 3960 *F. solani*; F 1667 *F. sporotrichioides* (Всерос. коллекция микроорганизмов, г. Пущино, Московская обл.); *Fusarium oxysporum* Schlechtendal, 1824 (Коллекция РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева); *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, 1976 (ФГБУ ВНИИКР, Россия).

Поиск консервативных последовательностей ДНК проводили в базе данных NCBI GenBank. Для создания множественного выравнивания использовали программу MAFFT v.7.520 для Windows. Биоинформатический анализ и обработку полученных результатов, а также визуализацию множественных выравниваний производили с использованием программного обеспечения UGENE («Унипро», Россия) и AliView (NBIS, Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Швеция).

Результаты и их обсуждение

Было проанализировано 35 сортообразцов озимой тритикале на наличие грибов рода *Fusarium* методом ПЦР в режиме реального времени. У всех исследуемых образцов наблюдался рост кинетической кривой флуоресценции как по каналу специфичной реакции (FAM), так и по каналу детекции внутреннего положительного контроля (HEX) (рис. 1).

При проведении анализа данных за положительный результат принимали образцы, уровень сигнала флуоресценции которых составлял не меньше 30% от максимального уровня сигнала, полученного в ходе эксперимента. Помимо уровня сигнала, учитывали пороговый цикл (табл. 1).

Результаты анализа показывают, что во всех исследуемых образцах озимой тритикале присутствуют грибы рода *Fusarium*. Среднее значение порогового цикла составило 24,32, что соответствует среднему уровню зараженности. При проведении исследований ложноположительные результаты и полное ингибирование реакций отсутствовали.

Для определения видового состава изучаемых грибов в исследуемом материале были сконструированы олигонуклеотиды для дифференциации *F. poae*, *F. graminearum* и *F. culmorum* методом ПЦР в режиме реального времени (табл. 2).

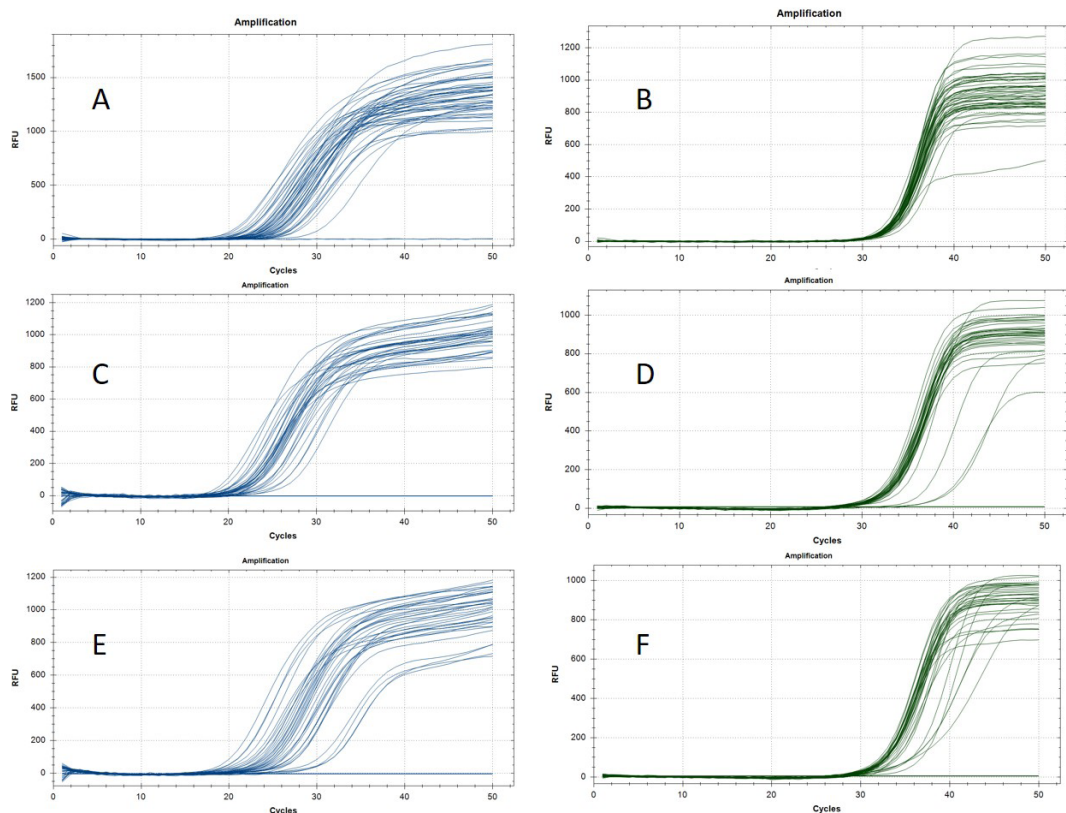


Рис. 1. Результаты анализа методом ПЦР-РВ 35 образцов озимой тритикале за 3 года возделывания; данные по каналу флуоресценции FAM и HEX; (А и В) – 2020 г., (С и D) – 2021 г., (Е и F) – 2022 г.; интерфейс Bio-Rad CFX Manager; ось абсцисс – пороговый цикл (cycles), ось ординат – относительные единицы флуоресценции (RFU)

Таблица 1

Пороговые циклы, полученные при проведении ПЦР-РВ по каналу детекции специфичной реакции у 35 сортов образцов озимой тритикале за 3 года выращивания

№	Наименование и происхождение исследуемых сортов образцов	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
1	К-3866 Marko (Польша)	23,35	21,87	26,41
2	К-3862 (НИИСХ Сев-Зап.)	22,03	18,92	22,79
3	К-3861 Немчиновский 56 (МосНИИСХ «Немчиновка»)	23,61	22,17	20,45
4	К-3857 ПРАГ 520 (Дагестан)	25,79	21,78	23,90
5	К-3865 Prado (Польша)	24,76	22,80	27,34
6	К-3864 SW Algalo (Швеция)	26,64	22,94	24,60
7	К-3855 ПРАГ 510 (Дагестан)	24,91	20,09	25,65

№	Наименование и происхождение исследуемых сортообразцов	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
8	К-3860 Легион (ДЗНИИСХ)	23,24	20,61	22,76
9	К-3858 Докучаевский 5 (НИИСХ)	24,29	22,01	25,97
10	К-3852 ПРАГ 506 (Дагестан)	27,79	21,07	21,57
11	К-3854 ПРАГ 508 (Дагестан)	24,98	20,48	21,23
12	К-3850 ПРАГ205–3 (Дагестан)	26,00	22,91	26,99
13	К-3853 ПРАГ507 (Дагестан)	20,67	23,65	27,14
14	К-3851 ПРАГ502 (Дагестан)	25,69	22,96	31,43
15	К3848 Dsorno (Германия)	22,19	22,73	23,67
16	К-3846 Устинья (Самара)	22,21	22,62	24,51
17	К-3843 Witon (Польша)	23,25	22,38	25,82
18	К-3842 ПРАГ 519	21,26	22,45	25,58
19	К-3840 Presto 401 (Польша)	26,65	22,58	25,24
20	К-3832 ПРАГ-0–523 (Дагестан)	25,26	25,14	26,05
21	К-3849 Partout (Германия)	23,07	26,40	27,71
22	К-3845 Варвара (Самарская обл.)	27,98	27,38	25,33
23	К-3844 Krakowiak (Польша)	25,23	22,66	29,88
24	К-3841 ПРАГ518 (Дагестан)	22,24	24,22	22,54
25	К-3839 Бард (ДЗНИИСХ)	23,81	23,00	24,94
26	К-3750 Timlo (Франция)	21,50	22,80	26,98
27	К-3751 Magnat (Польша)	24,37	21,59	23,93
28	К-3738 ЛОГ8 (Омская обл.)	23,26	23,17	24,54
29	К-3754 Lamberto (Франция)	24,69	26,27	30,55
30	К-3741 ПРАГ черноколосый	26,07	24,70	27,81
31	К-3748 Lupus (Германия)	25,15	24,09	25,24
32	К-3757 Кастусь (Беларусь)	25,87	23,12	22,45
33	К-3755 Алесь (Беларусь)	25,82	23,66	31,33
34	К3727 СНТ-5/92 (Омская обл.)	25,11	24,31	24,81
35	К-3728 СНТ-11/92 (Омская обл.)	25,77	24,29	28,49

Примечание. ct – полученное значение порогового цикла ПЦР-РВ.

**Последовательность праймеров и зондов
для идентификации 3 видов рода *Fusarium***

Название	Мишень	Последовательность	Референсные последовательности, NCBI
Fus.gram_F	galactose oxidase	5'-AACGGTGGTGGTGGTCTTTGT-3'	XM_011327027.1
Fus.gram_Pb		5'-(FAM)TCGGTGGCAGGATCACAACTCTCGA(RTQ1)-3'	
Fus.gram_R		5'-TTTCCTCCATTGTTTGTCTAG-3'	
Fus.culm_F	genomic DNA	5'-TCTATCACAGCATTCCCTC-3'	LT598661.1
Fus.culm_Pb		5'-(FAM)TGCGGGCGGTCTTTGCGGTGATT(RTQ1)-3'	
Fus.culm_R		5'-TGTCGCGAGATTGCCGTTGCTG-3'	
Fus.poa_F	genomic DNA	5'-ACCGACTTCAGGACGTGTCC-3'	XM_044854194.1
Fus.poa_Pb		5'-(FAM)TCTTATCGCAATGATGCATTCCGGA(RTQ1)-3'	
Fus.poa_R		5'-ATCCCAGGAAGAGGTCAAAGTG-3'	

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный праймер, Pb – зонд.

Для определения аналитической специфичности вышеуказанных праймеров и зондов использовали выборку из 66 близкородственных организмов. Результаты исследования показали 100%-ную специфичность разработанных олигонуклеотидов, поскольку при внесении нуклеиновых кислот других грибов ложноположительные реакции отсутствовали.

Аналитическую чувствительность определяли путем последовательного десятикратного разведения целевого образца с известной концентрацией. Для видов *F. poae*, *F. graminearum* и *F. culmorum* использовали образец ДНК, выделенный из чистой культуры гриба со следующими концентрациями 1,11 нг/мкл, 5,7 нг/мкл и 14 нг/мкл соответственно. Каждую реакцию проводили в двукратной повторности для более достоверного результата (рис. 2).

По полученным данным был определен предел чувствительности разработанных праймеров. Так, для вида *F. poae* было установлено, что при разведении образца до $1,11 \times 10^{-4}$ нг/мкл (2 копии ДНК патогена) реакция проходит нестабильно, при разведении до $1,11 \times 10^{-5}$ нг/мкл специфичная реакция отсутствовала полностью. Для видов *F. graminearum* и *F. culmorum* было определено разведение $5,7 \times 10^{-5}$ нг/мкл (1 копия ДНК патогена) и 14×10^{-5} нг/мкл (3 копии ДНК патогена) соответственно, при котором реакция проходит нестабильно, и разведение до $5,7 \times 10^{-6}$ нг/мкл и 14×10^{-6} нг/мкл соответственно, при котором специфичная реакция отсутствует полностью. Для данного эксперимента среднее значение эффективности прохождения реакции E составило 104%.

С использованием разработанных праймеров и зондов нами были проанализированы 35 образцов озимой тритикале за 3 года возделывания на наличие исследуемых возбудителей фузариозов (табл. 3–5).

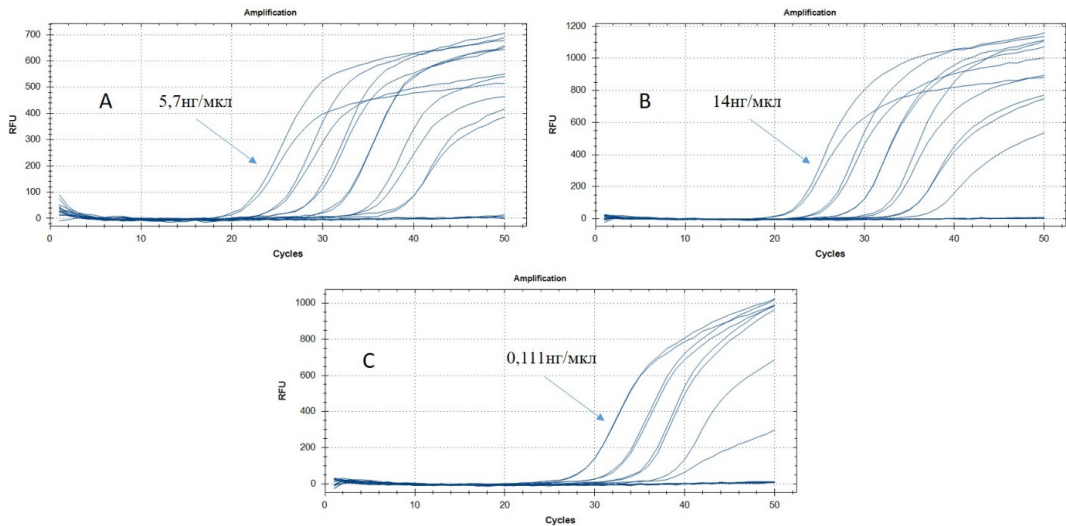


Рис. 2. Результаты проведения серии 10-кратного разведения образца ДНК гриба с известной концентрацией по каналу флуоресценции FAM;
 А – *F. graminearum*, В – *F. culmorum*, С – *F. roae*;
 интерфейс Bio-Rad CFX Manager; ось абсцисс – пороговый цикл (cycles),
 ось ординат – относительные единицы флуоресценции (RFU)

Таблица 3

Результаты диагностики образцов озимой тритикале на наличие гриба *F. roae*

№	Сортообразцы	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
1	Марко, Польша	27,22	29,61	31,39
2	НИИСХ Сев-Зап.	27,07	26,48	29,38
3	Немчиновский 56 МосНИИСХ «Немчиновка»	28,19	28,49	28,16
4	ПРАГ 520 (Дагестан)	30,68	29,08	29,31
5	Prado (Польша)	35,34	28,37	31,60
6	SW Algalo (Швеция)	28,56	28,83	29,92
7	ПРАГ 510 (Дагестан)	28,26	26,98	30,46
8	Легион (ДЗНИИСХ)	28,98	26,48	28,90
9	Докучаевский 5 (НИИСХ)	28,81	27,75	30,74
10	ПРАГ 506 (Дагестан)	30,17	26,73	28,53
11	ПРАГ 508 (Дагестан)	28,50	26,27	27,02
12	ПРАГ205–3 (Дагестан)	30,31	27,80	31,70

№	Сортообразцы	Пороговый цикл, сг		
		2020 год	2021 год	2022 год
13	ПРАГ507 (Дагестан)	31,00	28,73	32,33
14	ПРАГ502 (Дагестан)	33,46	28,53	N/A
15	Dsorno (Германия)	32,53	28,74	30,37
16	Устинья (Самара)	30,20	28,86	30,83
17	Witon (Польша)	28,91	28,37	30,77
18	ПРАГ 519	29,49	27,90	31,59
19	Presto 401 (Польша)	33,90	28,61	27,32
20	ПРАГ-0–523 (Дагестан)	32,11	31,19	30,82
21	Partout (Германия)	31,55	N/A	31,50
22	Варвара (Самарская обл.)	27,87	N/A	32,67
23	Krakowiak (Польша)	28,93	N/A	30,83
24	ПРАГ518 (Дагестан)	29,15	29,32	34,11
25	Бард (ДЗНИИСХ)	29,89	28,62	28,95
26	Timlo (Франция)	28,58	28,78	30,37
27	Magnat (Польша)	31,51	26,52	31,56
28	ЛОГ8 (Омская обл.)	30,45	28,69	29,63
29	Lamberto (Франция)	28,51	30,86	29,52
30	ПРАГ черноколосый	27,23	29,59	35,34
31	Lupus (Германия)	32,85	29,31	31,56
32	Кастусь (Беларусь)	29,32	28,92	30,59
33	Алесь (Беларусь)	33,92	29,74	28,83
34	СНТ-5/92 (Омская обл.)	29,14	29,42	N/A
35	СНТ-11/92 (Омская обл.)	32,77	29,68	30,70

Примечание. N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; сг – полученное значение порогового цикла ПЦР-РВ.

**Результаты диагностики образцов озимой тритикале
на наличие гриба *F. graminearum***

№	Сортообразцы	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
1	Марко, Польша	N/A	29,61	31,39
2	НИИСХ Сев-Зап.	N/A	26,48	29,38
3	Немчиновский 56 МосНИИСХ «Немчиновка»	N/A	28,49	28,16
4	ПРАГ 520 (Дагестан)	N/A	29,08	29,31
5	Prado (Польша)	N/A	28,37	31,60
6	SW Algalo (Швеция)	N/A	28,83	29,92
7	ПРАГ 510 (Дагестан)	N/A	26,98	30,46
8	Легион (ДЗНИИСХ)	N/A	26,48	28,90
9	Докучаевский 5 (НИИСХ)	29,77	27,75	30,74
10	ПРАГ 506 (Дагестан)	N/A	26,73	28,53
11	ПРАГ 508 (Дагестан)	31,05	26,27	27,02
12	ПРАГ205–3 (Дагестан)	29,53	27,80	31,70
13	ПРАГ507 (Дагестан)	N/A	28,73	32,33
14	ПРАГ502 (Дагестан)	N/A	28,53	N/A
15	Dsorno (Германия)	31,86	28,74	30,37
16	Устинья (Самара)	33,63	28,86	30,83
17	Witon (Польша)	N/A	28,37	30,77
18	ПРАГ 519	36,53	27,90	31,59
19	Presto 401 (Польша)	N/A	28,61	26,85
20	ПРАГ-0–523 (Дагестан)	30,00	31,19	30,82
21	Partout (Германия)	N/A	N/A	31,50
22	Варвара (Самарская обл.)	N/A	N/A	32,67
23	Krakowiak (Польша)	N/A	N/A	30,83
24	ПРАГ518 (Дагестан)	N/A	29,32	34,11
25	Бард (ДЗНИИСХ)	N/A	28,62	28,95

№	Сортообразцы	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
26	Timlo (Франция)	N/A	28,78	30,37
27	Magnat (Польша)	36,39	26,52	31,56
28	ЛОГ8 (Омская обл.)	N/A	28,69	29,63
29	Lamberto (Франция)	35,17	30,86	29,52
30	ПРАГ черноколосый	N/A	29,59	35,34
31	Lupus (Германия)	35,90	29,31	31,56
32	Кастусь (Беларусь)	N/A	28,92	30,59
33	Алесь (Беларусь)	N/A	29,74	28,83
34	СНТ-5/92 (Омская обл.)	31,29	29,42	N/A
35	СНТ-11/92 (Омская обл.)	N/A	29,68	30,70

Примечание. N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; ct – полученное значение порогового цикла ПЦР-РВ.

Таблица 5

**Результаты диагностики образцов озимой тритикале
на наличие гриба *F. culmorum***

№	Наименование исследуемых образцов	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
1	Марко, Польша	N/A	N/A	N/A
2	НИИСХ Сев-Зап.	N/A	N/A	N/A
3	Немчиновский 56 МосНИИСХ «Немчиновка»	N/A	N/A	25,76
4	ПРАГ 520 (Дагестан)	N/A	N/A	27,28
5	Prado (Польша)	N/A	N/A	N/A
6	SW Algalo (Швеция)	N/A	N/A	N/A
7	ПРАГ 510 (Дагестан)	29,77	N/A	N/A
8	Легион (ДЗНИИСХ)	N/A	N/A	N/A
9	Докучаевский 5 (НИИСХ)	31,05	N/A	28,73
10	ПРАГ 506 (Дагестан)	29,53	N/A	N/A

№	Наименование исследуемых образцов	Пороговый цикл, ct		
		2020 год	2021 год	2022 год
11	ПРАГ 508 (Дагестан)	N/A	N/A	N/A
12	ПРАГ205–3 (Дагестан)	N/A	N/A	31,93
13	ПРАГ507 (Дагестан)	31,86	N/A	N/A
14	ПРАГ502 (Дагестан)	33,63	N/A	N/A
15	Dsorno (Германия)	N/A	N/A	N/A
16	Устинья (Самара)	36,53	N/A	N/A
17	Witon (Польша)	N/A	N/A	N/A
18	ПРАГ 519	30,00	N/A	29,62
19	Presto 401 (Польша)	N/A	N/A	N/A
20	ПРАГ-0–523 (Дагестан)	N/A	N/A	N/A
21	Partout (Германия)	N/A	N/A	N/A
22	Варвара (Самарская обл.)	N/A	N/A	N/A
23	Krakowiak (Польша)	N/A	N/A	N/A
24	ПРАГ518 (Дагестан)	N/A	N/A	N/A
25	Бард (ДЗНИИСХ)	36,39	N/A	31,15
26	Timlo (Франция)	N/A	N/A	33,55
27	Magnat (Польша)	35,17	N/A	N/A
28	ЛОГ8 (Омская обл.)	N/A	N/A	N/A
29	Lamberto (Франция)	35,90	N/A	N/A
30	ПРАГ черноколосый	N/A	N/A	30,06
31	Lurus (Германия)	N/A	N/A	N/A
32	Кастусь (Беларусь)	31,29	N/A	27,82
33	Алесь (Беларусь)	N/A	N/A	N/A
34	СНТ-5/92 (Омская обл.)	34,52	N/A	N/A
35	СНТ-11/92 (Омская обл.)	N/A	N/A	N/A

Примечание. N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; ct – полученное значение порогового цикла ПЦР-РВ.

Анализ полученных результатов показывает, что за период с 2020 по 2022 гг. во всех образцах озимой тритикале присутствуют представители грибов рода *Fusarium*. Самым часто встречаемым видом оказался *F. roae*, который был выявлен во всех исследуемых образцах 2020 г., однако за 2021 г. некоторые образцы, а именно К-1–19 № 23 К-3849 Partout (Германия), К-1–19 № 24 К-3845 Варвара (Самарская обл.) и К-1–19 № 25 К-3844 Krakowiak (Польша), показали отсутствие данного вида, хотя анализ этих образцов за 2022 г. указывает на повторное появление *F. roae*. Также за 2022 г. данный вид отсутствовал в образцах К-1–19 № 14 К-3851 ПРАГ 502 (Дагестан) и К-1–19 № 42 К3727 СНТ-5/92 (Омская обл.).

За 2020 г. вид *F. graminearum* был выявлен только у 11 из 35 исследуемых образцов. Однако за период 2021–2022 гг. количество образцов озимой тритикале, зараженных патогеном, значительно возросло. Так, для урожая 2021 г. *F. graminearum* был выявлен у 32 образцов семян, а для 2022 г. – у 33.

При анализе озимой тритикале 2020 г. на наличие нуклеиновых кислот гриба *F. culmorum* было выявлено заражение у 12 образцов. При исследовании тритикале урожая 2021 г. зараженных образцов исследуемым патогеном обнаружено не было, однако было выявлено повторное появление патогена у 9 образцов 2022 г.

Разные соотношения видового состава возбудителей фузариозов на озимой тритикале за 3 года выращивания могут быть связаны с изменением погодных-климатических условий. Колебания температуры и влажности в период вегетации растений могут способствовать развитию исследуемых патогенов. По данным литературы, для *F. roae* оптимальным для роста считается сухой и теплый климат, в то время как для *F. graminearum* предпочтительным является высокая влажность и температура +25...+30°C [17, 22].

Отсутствие изучаемых видов грибов у некоторых образцов за период 2020–2022 г. также может быть связано с весьма маленькой концентрацией патогена в зерновках. Дополнительный анализ почвы и корневой части растения может помочь подтвердить отсутствие вышеуказанных грибов. Последующие работы по созданию систем идентификации видов рода *Fusarium* позволят более точно установить состав грибной популяции и использовать обнаруженные изоляты для испытаний новых сортов тритикале на устойчивость к фузариозам.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что разработанные праймеры и зонды позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью проводить диагностику на наличие трех возбудителей фузариозов.

Данные видовой диагностики образцов озимой тритикале за 3 года выращивания показали, что преобладающим видом исследуемых грибов оказался *F. roae*. Им были заражены 95,2% всех образцов 3 лет возделывания. Резкое увеличение распространения *F. graminearum* было обнаружено у образцов тритикале за период с 2020 по 2021 г. Так, в 2020 г. было поражено только 31,4% исследуемых образцов, а в 2021 г. заражение составило 91,4%. Для *F. culmorum* общее заражение по этим годам составило всего 20%.

Полное отсутствие исследуемых патогенов отмечено у ПРАГ 502 (Дагестан) и СНТ-5/92 (Омская обл.) в 2022 г.

Библиографический список

1. Голиков Н.Н. Клещевина, устойчивая к фузариозу // Защита и карантин растений. – 2003. – № 3. – С. 44.
2. Иващенко В.Г. Географическое распространение и особенности биоэкологии *Fusarium graminearum* Schwabe // Микология и фитопатология. – 1998. – Т. 32, № 5. – С. 1–10.

3. Костерина Н.А. Анализ современного состояния проблемы фузариоза колоса и зерна пшеницы в Российской Федерации // Аграрный вестник Урала. – 2023. – № 5 (234). – С. 49–59.
4. Курилова Д.А. Вредоносность фузариоза сои в зависимости от степени поражения растений // Масличные культуры. – 2010. – № 2. – С. 144–145.
5. Фитопатология. Болезни древесных и кустарниковых пород: Учебное пособие / Под общ. ред. И.И. Минкевича. – СПб.: Лань, 2011. – 160 с.
6. Монастырский О.А. Микотоксины – глобальная проблема безопасности продуктов питания и кормов // Агрохимия. – 2016. – № 6. – С. 67–71.
7. Платонова Ю.В., Сурин Н.А. География грибов рода *Fusarium* (литературный обзор) // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 4. – С. 95–97.
8. Попов В.С., Самбуров Н.В., Воробьева Н.В. Проблемы микотоксикозов в современных условиях и принципы профилактических решений: Монография. – Курск: Планета+, 2018. – С. 158.
9. Попова С.А., Скопцова Т.И., Лосякова Е.В. Микотоксины в кормах: причины, последствия, профилактика // Известия Великолукской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. – № 1. – С. 16–23.
10. Соколова Г.Д. Внутривидовое разнообразие фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* // Микология и фитопатология. – 2015. – № 2 (49). – С. 71–79.
11. Торопова Е.Ю., Селюк М.П., Казакова О.А. Факторы доминирования грибов рода *Fusarium* в патокмлексе корневых гнилей зерновых культур // Агрохимия. – 2018. – № 5. – С. 73–82.
12. Brennan J., Fagan B., Van Maanen A. et al. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi // European Journal of Plant Pathology. – 2003. – № 109 (6). Pp. 577–587.
13. Cirlini M., Generotti S., Dall’Erta A. et al. Durum Wheat (*Triticum Durum* Desf.) Lines Show Different Abilities to Form Masked Mycotoxins under Greenhouse Conditions // Toxins. – 2014. – № 6 (1). – Pp. 81–95.
14. Ekwomadu T.I., Mwanza M. *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research // Agriculture. – 2023. – № 13 (9). – Pp. 1810.
15. Gil-Serna J., Vázquez C., González-Jaén M.T. et al. Mycotoxins Toxicology // Encyclopedia of Food Microbiology. – 2014. – Pp. 887–892.
16. Matny O., Bates S., Song Z. Geographic distribution of *Fusarium culmorum* chemotypes associated with wheat crown rot in Iraq // Journal of Plant Protection Research. – 2017. – № 57 (1).
17. Parry D., Jenkinson P., Mcleod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review // Plant Pathology. – 1995. – № 44. – Pp. 207–238.
18. Rassat A. *Fusarium poae* and *Fusarium langsethiae* in an oat field—time point of infection and possible inoculum sources, 2019.
19. Tóth A., Barna-Vetrő I., Gyöngyösi Á. et al. Prevalence and mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from wheat grains in Hungary // Acta Phytopath. Entomol. Hung. – 1993. – № 28. – Pp. 3–12.
20. Wagacha J., Muthomi J. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat // Crop Protection. – 2007. – № 26 (7). – Pp. 877–885.
21. Wilcoxson R., Kommedahl T., Ozmon E. et al. Occurrence of *Fusarium* species in scabby wheat from Minnesota and their pathogenicity to wheat // Phytopathology. – 1988. – № 78. – Pp. 586–589.

22. Xu X., Nicholson P., Thomsett M. et al. Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions // *Phytopathology*. – 2008. – № 98 (1). – Pp. 69–78.

23. Yli-Mattila T., Opoku J., Ward T.J. Population structure and genetic diversity of *Fusarium graminearum* from southwestern Russia and the Russian Far East as compared with northern Europe and North America // *Mycologia*. – 2023. – № 1(11).

OPTIMIZATION OF MOLECULAR DIAGNOSTICS OF FUSARIUM PATHOGENS IN WINTER TRITICALE (*TRITICOSECALE* WITTM. & A. CAMUS)

A.A. SHVARTSEV^{1,2}, M.L. KONY SHEVA¹, S.A. SAVINOVA¹,
YA.I. ALEKSEEV^{1,3}, V.V. PYLNEV²

(¹LLC “Research and Production Company Syntol”;

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

³Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences)

Phytopathogenic fungi are among the most common and dangerous plant pathogens, causing significant crop losses and considerable economic costs. The greatest damage to agricultural crops is caused by fungi of the genus Fusarium, making the study of their distribution, species diversity and diagnostic methods more in demand every year. This is particularly important for breeding purposes. The determination of the species composition of this pathogen allows not only to evaluate the level of infestation, but also to perform preventive selection for resistance to Fusarium. The aim of the study was to test the developed primers and probes for the identification of the most common representatives of the genus Fusarium such as F. culmorum, F. graminearum and F. poae. Pure cultures of fungi obtained from different collections of microorganisms were used as research material. We studied 35 varieties of winter triticale from the RSAU-MTAA collection. In order to differentiate the studied species, oligonucleotides were designed for a fragment of the Galactose oxidase (GalOx) gene and its homologous genes from the NCBI database. Diagnosis was performed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The main analytical characteristics of the developed primers such as specificity and sensitivity were determined. Screening of 35 varieties of winter triticale showed their infestation with fungi of the genus Fusarium. It was revealed that the predominant species was F. poae, which was found in 95.2% of the varieties. For F. graminearum, the highest prevalence was found between 2020 and 2021, when the infestation of triticale samples was 31.4% and 91.4%, respectively. F. culmorum had the lowest percentage of infestation, being found in only 20% of all samples. In addition, the winter triticale varieties of the 2022 harvest K-1–19#14 K-3851 PRAG502 (Dagestan) and K-1–19#42 K3727 SNT-5/92 (Omsk region) were identified as the least susceptible to infestation by the studied species of fungi.

Keywords: breeding for resistance, phytopathogenic fungi, *Fusarium*, real-time PCR, diagnostics, winter triticale, species diversity, infestation.

References

1. Golikov N.N. Castor, resistant to *Fusarium*. *Plant Protection and Quarantine*. 2003;3:44. (In Russ.)
2. Ivashchenko V.G. *Fusarium graminearum* Schwabe geographical distribution and features of bioecology. *Mycology and Phytopathology*. 1998;32(5):1–10. (In Russ.)
3. Kosterina N.A. Analysis of the current state of the problem of *Fusarium* ear and grain of wheat in the Russian Federation. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2023;05(234):49–59. (In Russ.)

4. Kurilova D.A. Harmfulness of *Fusarium* species on soybean depending on a degree of plants affection. *Oil Crops*. 2010;2:144–145. (In Russ.)
5. *Phytopathology. Diseases of tree and shrub species: a textbook*. Ed. by I.I. Minkevich. St. Petersburg, Russia: Izdatel'stvo Lan', 2011:160. (In Russ.)
6. Monastyrskii O.A. Mycotoxins – a global problem of food and feed safety. *Agrohimia*. 2016;6:67–71. (In Russ.)
7. Platonova Yu.V., Surin N.A. Geography of fungi of the genus *Fusarium* (literary review). *Fundamental'nye issledovaniya*. 2004; 4: 95–97. (In Russ.)
8. Popov V.S., Samburov N.V., Vorob'eva N.V. *The problem of mycotoxicoses in modern conditions and principles of preventive solutions: monografiya*. Kursk, Russia: Planeta+, 2018:158. (In Russ.)
9. Popova S.A., Skoptsova T.I., Losyakova E.V. Mycotoxins in feed: causes, consequences, prevention. *Izvestiya Velikolukskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*. 2017;1:16–23. (In Russ.)
10. Sokolova G.D. Intraspecific diversity of phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Mycology and Phytopathology*. 2015;2(49):71–79. (In Russ.)
11. Toropova E.Yu., Selyuk M.P., Kazakova O.A. Dominance factors of fungi genus *Fusarium* in grain crops root rot pathocomplex. *Agrohimia*. 2018;5:73–82. (In Russ.)
12. Brennan J., Fagan B., Van Maanen A. et al. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 2003;109(6): 577–587.
13. Cirlini M., Generotti S., Dall'Erta A. et al. Durum Wheat (*Triticum Durum* Desf.) Lines Show Different Abilities to Form Masked Mycotoxins under Greenhouse Conditions. *Toxins*. 2014;6(1):81–95.
14. Ekwomadu T.I., Mwanza M. *Fusarium Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. Agriculture*. 2023;13(9):1810.
15. Gil-Serna J., Vázquez C., González-Jaén M.T. et al. Mycotoxins: Toxicology. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014:887–892.
16. Matny O., Bates S., Song Z. Geographic distribution of *Fusarium culmorum* chemotypes associated with wheat crown rot in Iraq. *Journal of Plant Protection Research*. 2017;57(1).
17. Parry D., Jenkinson P., Mcleod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals: a review. *Plant Pathology*. 1995;44:207–238.
18. Rassat A. *Fusarium poae* and *Fusarium langsethiae* in an oat field—time point of infection and possible inoculum sources. *Biology, Environmental Science, Agricultural and Food Sciences*. 2019.
19. Tóth A., Barna-Vetrő I., Gyöngyösi Ä. et al. Prevalence and mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from wheat grains in Hungary. *Acta Phytopath. Entomol. Hung*. 1993;28: 3–12.
20. Wagacha J., Muthomi J. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*. 2007;26(7):877–885.
21. Wilcoxson R., Kommedahl T., Ozmon E. et al. Occurrence of *Fusarium* species in scabby wheat from Minnesota and their pathogenicity to wheat. *Phytopathology*. 1988;78:586–589.
22. Xu X., Nicholson P., Thomsett M. et al. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*. 2008;98(1):69–78.
23. Yli-Mattila T., Opoku J., Ward T.J. Population structure and genetic diversity of *Fusarium graminearum* from southwestern Russia and the Russian Far East as compared with northern Europe and North America. *Mycologia*. 2023:1–11.

Сведения об авторах

Шварцев Алексей Анатольевич, научный сотрудник ООО «Синтол», аспирант РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127434, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; Российская Федерация, 127434, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; тел.: (925) 161–15–63; e-mail: alexey.sva@yandex.ru

Коньшева Мария Леонидовна, научный сотрудник ООО «Синтол»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; тел.: (920) 627–04–90; e-mail: mariakorolewa@inbox.ru

Савинова Софья Алексеевна, научный сотрудник ООО «Синтол»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; тел.: (967) 135–13–59; e-mail: sofasavinova@yandex.ru

Алексеев Яков Игоревич, канд. биол. наук, директор по науке ООО «Синтол», ведущий научный сотрудник ИАП РАН; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН; 198095, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33; тел.: (916) 628–00–31; e-mail: jalex2071@gmail.com

Пыльнев Владимир Валентинович, д-р биол. наук, профессор кафедры генетики, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127434, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (915) 093–07–85; e-mail: pyl8@yandex.ru

Information about the authors

Alexey A. Shvartsev, Research Associate at ООО “Syntol”, postgraduate student, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (42 Timiryzevskaya St., Moscow, 127434, Russian Federation; 49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (925) 161–15–63; e-mail: alexey.sva@yandex.ru)

Marya L. Konysheva, Research Associate at ООО “Syntol” (42 Timiryzevskaya St., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (967) 627–04–90; e-mail: mariakorolewa@inbox.ru)

Sofya A. Savinova, Research Associate at ООО “Syntol” (42 Timiryzevskaya St., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (920) 135–13–59; e-mail: sofasavinova@yandex.ru)

Yakov I. Alekseev, CSc (Bio), Director of Science, ООО “Syntol”, Leading Research Associate, Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences (42 Timiryzevskaya St., Moscow, 127434, Russian Federation; 31–33, Ivana Chernykh St., St. Petersburg, 198095, Russian Federation; phone: (916) 628–00–31; e-mail: jalex2071@gmail.com)

Vladimir V. Pylnev, DSc (Bio), Professor at the Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Production, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryzevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (915) 093–07–85; e-mail: pyl8@yandex.ru)