

УДК 632.4.01/.08

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-352-9-118-124>

Оригинальное исследование/Original research

Соколова Л.М.,  
Егорова А.А.,  
Ховрин А.Н.

Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», д. Верея, стр. 500, Московская обл., 140153, Россия

**Ключевые слова:** ПЦР, праймеры SSR и ISSR, *Fusarium*, фитопатогены, почва, растения, оценка моркови столовой, селекция

**Для цитирования:** Соколова Л.М., Егорова А.А., Ховрин А.Н. Определение видовой принадлежности грибов рода *Fusarium* молекулярным методом. Аграрная наука. 2021; 352 (9): 118–124.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-352-9-118-124>

**Конфликт интересов отсутствует**

Lyubov M. Sokolova,  
Anna A. Yegorova,  
Aleksandr N. Khovrin

All-Russian Research Institute of Vegetable Crop Production — branch of Federal Scientific Center of Vegetable Crop Production, 140153, d. Vereya, p. 500, Moscow region, 140153, Russia

**Key words:** PCR, ISSR and SSR primers, *Fusarium*, phytopathogens, soil, plants, evaluation of table carrots, selection

**For citation:** Sokolova L.M., Yegorova A.A., Khovrin A.N. Determination of the species of fungi of the genus *Fusarium*, by molecular method. Agrarian Science. 2021; 352 (9): 118–124. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-352-9-118-124>

**There is no conflict of interests**

# Определение видовой принадлежности грибов рода *Fusarium* молекулярным методом

## РЕЗЮМЕ

В настоящее время обнаружено более 10 000 видов грибов, ассоциированных с растениями, и не удивительно, что грибные заболевания наносят больший вред. Большинство видов рода *Fusarium* — почвенные сапротрофы, обитающие на мертвых растительных остатках, в ризосфере растений, на поверхности корней. Они вызывают гниль корней, семян, плодов, клубней, корнеплодов. Все формы фузариев прогрессируют при высоких температурах и влажности. Анализ литературных источников и экспериментальные данные позволили сформулировать цель наших исследований: «Провести анализ видового разнообразия грибов рода *Fusarium* из почвы, растений моркови столовой в зависимости от эколого-географических зон произрастания». В результате с помощью ПЦР-анализа выявлено 13 образцов, отнесенных к *F. langsethiae*; 2 образца *F. oxysporum*; 8 образцов *F. roae*; 2 *F. sporotrichioides*; 1 образец, отнесенный нами к *F. culmorum*, данный образец был собран в Ростовской области и Московской области. Также выявлено, что разнообразие почвенно-климатических условий в разных зонах ведет за собой смену видового состава представителей р. *Fusarium*: видовой состав грибов р. *Fusarium* существенно меняется в зависимости от агроклиматических условий. В более влажных и теплых условиях (южные регионы) доминируют специфические виды *F. culmorum*, *F. sporotrichiella*, *F. oxysporum*. Реже встречаются *F. heterosporum*, *F. nivale*; вид *F. graminearum* обитает на растительных остатках, на корнях растений или в зоне ризосферы, но практически не встречается в почве в чистом виде. Таким образом, данное направление является перспективным для изучения грибов рода *Fusarium*, так как данный микроорганизм обитает в почве и на растениях. Целесообразно выявлять патоген с образцов из разных областей, чтобы значительно увеличить репрезентативность выборок внутри областей с дальнейшим выявлением разнообразного мицелия и тем самым создавать шкалу мицелия.

## Determination of the species of fungi of the genus *Fusarium* by molecular method

### ABSTRACT

Currently, more than 10,000 species of fungi associated with plants have been found, and it is not surprising that fungal diseases cause a lot of harm. Most species of the genus *Fusarium* are soil protrophs that live on dead plant remains, in the rhizosphere of plants, on the surface of roots. They cause rot of roots, seeds, fruits, tubers, root crops. All forms of fusariums progress at high temperatures and humidity. The analysis of literary sources and experimental data allowed us to formulate the purpose of our research: "To analyze the species diversity of fungi of the genus *Fusarium* from the soil, table carrot plants, depending on the ecological and geographical zones of growth." As a result, using PCR analysis, 13 samples attributed to *F. langsethiae* were identified; 2 samples of *F. ochusohim*; 8 samples of *F. roae*; 2 of *F. sporotrichioides*; 1 sample attributed to *F. sulmorum*, this sample was collected in the Rostov region and the Moscow region. It was also revealed that the diversity of soil and climatic conditions in different zones leads to a change in the species composition of representatives of R. *Fusarium*: the species composition of fungi of R. *Fusarium* varies significantly depending on agro-climatic conditions. In wetter and warmer conditions (southern regions), specific species of *F. culmorum*, *F. sporotrichiella*, and *F. oxysporum* dominate. *F. heterosporum*, *F. nivale* are less common; *F. graminearum* species lives on plant residues, on plant roots or in the rhizosphere zone, but practically does not occur in the soil in its pure form. Thus, this direction is promising for the study of fungi of the genus *Fusarium*, since this microorganism lives in the soil and on plants. It is advisable to identify the pathogen from samples from different regions to significantly increase the representativeness of samples within the regions with further identification of diverse mycelium, thereby creating a scale of diverse mycelium.

Поступила: 7 апреля  
После доработки: 30 мая  
Принята к публикации: 10 сентября

Received: 7 April  
Revised: 30 May  
Accepted: 10 september

## Введение

Фитопатогенные грибы — наиболее опасные возбудители болезней растений, наносящие вред на всех стадиях производства растениеводческой продукции. К основным симптомам грибных болезней относятся увядание, пятнистость, налет (мицелий и спороношение гриба на поверхности пораженных органов), пустулы (скопление спороношений грибов), опухоли, деформации, мумификации (зараженная ткань ссыхается, темнеет, становится плотной) и гнили [1, 2].

Грибы из рода *Fusarium* широко распространены в природе и встречаются повсеместно. Большинство видов рода — почвенные сапротрофы, обитающие на мертвых растительных остатках, в ризосфере растений, на поверхности корней. Широкий диапазон приспособительных реакций видов этого рода обуславливает переход некоторых видов к факультативному паразитизму и существованию вирулентных рас, поражающих высшие растения. Они вызывают гниль корней, семян, плодов, клубней, корнеплодов. Поражают более 200 видов культурных и дикорастущих растений, вызывая их трахеомикозное увядание, задержку роста, корневые и стеблевые гнили, «черную ножку» сеянцев и др. Все формы фузариозов прогрессируют при высоких температурах и влажности [3, 2].

В настоящее время обнаружено более 10 000 видов грибов, ассоциированных с растениями, и не удивительно, что грибные заболевания наносят больший вред, чем болезни, вызываемые другими патогенными микроорганизмами [4].

Для фузариоза в настоящее время доступны следующие платформы по базам данных нуклеотидных последовательностей:

*Fusarium-ID* — сервис, ассоциированный с BLAST и состоящий из нуклеотидных последовательностей гена TEF 1α из различных видов фузариоза [5]. Последовательности из почти всех известных видов фузариоза были включены в данную систему. Для удобства работы были созданы еще две платформы: *Fusarium Comparative Genomics Platform* (FCGP), которая содержит пять полноразмерных геномов из четырех видов, и *Fusarium Community Platform* (FCP), подходящая для онлайн-поиска и имеющая обучающий форум. Все эти платформы объединены в *Cyber infrastructure for Fusarium* (CiF, <http://www.fusariumdb>) [6].

В настоящее время наряду с традиционной визуальной диагностикой и методом индикаторных растений для точного определения заболеваний растений необходимо использовать серологические методы и методы, основанные на ДНК- и РНК-технологиях. К основным распространенным методам серологической диагностики можно отнести иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, дот-блот-гибридизацию, иммунохроматографию [7], серологически специфичную электронную микроскопию [8].

Методы, использующие ДНК, включают флуоресцентную гибридизацию *in situ* [9], различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР), а именно: вложенную, кооперативную, мультиплексную, ПЦР в реальном времени и ДНК-фингерпринтинг. Эти методы позволяют быстро и точно детектировать патоген и определять его таксономическую принадлежность.

Классический подход состоит в культивировании фитопатогенов, находящихся в почве, при различных условиях и на различных средах, наиболее подходящих для анализируемого фитопатогена. При анализе образцов почвы главная задача — выделение ДНК из различных

микроорганизмов, находящихся в почвенном образце, а затем — специфичное обнаружение и мониторинг интересующего фитопатогена [10].

Кроме того, хорошим и надежным способом контроля прохождения ПЦР является использование внутреннего контроля. Подобный подход используется в мультиплексном [11], параллельном или методе добавления экзогенной ДНК и соответствующих праймеров для нее в каждую реакцию [12].

В настоящее время не существует универсальных протоколов для выделения ДНК фитопатогенов, но в то же время предложено множество методик по выделению ДНК из:

- растений — обобщены в работах [13, 14];
- грибов — [15, 16, 17, 18, 19, 20];
- почвы — обобщены в работе [21].

Главные преимущества методов ПЦР заключаются в высокой чувствительности, специфичности и надежности. Кроме того, нет необходимости выделять болезнетворный объект из зараженного материала, благодаря чему уменьшается время определения фитопатогена с недель до часов.

Анализ литературных источников позволил сформулировать цель наших исследований: провести анализ видового разнообразия грибов рода *Fusarium* из почвы, растений моркови столовой в зависимости от эколого-географических зон произрастания.

## Объекты исследований

В качестве объектов исследования использовали: семена, растения первого года жизни и почва из ризосферы произрастания моркови столовой с глубины 5, 10, 20 см. Отбор проводили с 2012 по 2018 гг. в трех географически удаленных регионах России — Воронежская ООС, Бирючукская ООС (Ростовская обл.), ВНИИО — филиал ФГБНУ ФНЦО (Московская обл.).

## Методика исследований

Учет интенсивности проявления болезней рассчитывали по следующим формулам. Распространенность (частота встречаемости) в %:

$$R = \frac{n \times 100}{N},$$

где  $n$  — количество пораженных растений,  $N$  — общее количество учетных растений.

Степень развития болезни подсчитывали по формуле:

$$R = \frac{\sum (xb) 100}{nc},$$

где  $R$  — степень поражения, %;  $r$  — число растений, имеющих одинаковый балл поражения;  $b$  — балл поражения;  $n$  — общее число учетных растений;  $c$  — высший балл шкалы, по которой проводили оценку поражения.

**Выделение грибных фитопатогенных организмов из почвы.** Пробы почвы (1 г) выкладывают в чашку Петри, увлажняют стерильной водой с помощью шприца (0,5–0,7 мл, в зависимости от структуры почвы) и накрывают почву предметным стеклом, слегка прижимая его к почве. Образцы помещают в термостат с температурой 25 °C [22].

**Выделение патогенов из растительного материала.** Исследуемый материал предварительно отмывают от почвенных частиц и проводят поверхностную стерилизацию для освобождения от эпифитной микобиоты.

Поверхностную стерилизацию анализируемого материала проводят 1%-ным раствором  $\text{KMnO}_4$  (10 минут) с последующим промыванием дистиллированной водой. На границе пораженной и здоровой ткани стерильным скальпелем вырезают небольшие кусочки и раскладывают в приготовленные чашки Петри на питательную среду. После чего помещают в термостат, инкубируют при температуре  $+23...+25\text{ }^\circ\text{C}$ . Через 5 суток появившийся грибной налет анализируют в поле зрения микроскопа при увеличении  $16\times 40$  и отбирают образцы для пересева на питательные среды для выделения в чистые культуры [23, 24].

Идентификация патогенов по «Определителю патогенных и условно патогенных грибов», 2001 [25].

Метод получения моноспоровой культуры. При проведении теоретических исследований или анализе популяции какой-либо географической формы с помощью ПЦР-анализа возникает необходимость получения культуры из одной споры — «моноспоровая культура».

Материалом для выделения моноспоровой культуры служит 20-суточная чистая культура патогенов [26].

### Результаты и обсуждения

При проведении теоретических исследований и анализе популяций какой-либо географической формы, выявлении продуцентов и др. возникает необходимость получения культуры из одной споры — моноспоровой культуры.

Культивирование гриба является необходимым предварительным этапом при стандартных методиках ПЦР.

В результате исследований образцов из различных регионов произрастания были проведены выделения изолятов грибов методами: «контактных стекол», раскладка листьев и стебля на агаризованную среду и посев суспензии смыва с листьев в разных концентрациях.

Для идентификации фитопатогенных микроорганизмов применяли метод ПЦР. Он превосходит традиционные методы по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа, производительности и служит их существенным дополнением [27].

В таблице 1 представлены праймеры и виды грибов рода *Fusarium* (определенные по определителю), с помощью которых проводилась видовая идентификация изучаемых в работе образцов.

FSPOf/FSPWr (*F. langsethiae*) (рис. 1). По литературным данным ожидаемый фрагмент 300 п.н, однако ни у одного из образцов данный

фрагмент выявлен не был. Но был выявлен ярко амплифицирующийся фрагмент размером около 600 п.н. На основании данной амплификации нам удалось дифференцировать ряд образцов из коллекции.

Ожидаемый размер маркерного фрагмента — 300 п.н. (отсутствует у всех образцов). У образцов 101, 103, 106p, 111, 121, 122, 130, 131p, 148p присутствует фрагмент размером около 600 п.н. M — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher

Таблица 1. Определение видовой принадлежности образцов моноспоровой культуры грибов рода *Fusarium* с помощью ПЦР-маркеров

Table 1. Determination of the species belonging of samples of monosporous culture of fungi of the genus *Fusarium* using PCR markers

Праймеры		Определяемый вид	Программа амплификатора	Размер целевого ПЦР-продукта, п.н.
прямой	обратный			
FSPO, f	FPOW, r	<i>F. langsethiae</i>	ITS	300
IGS	CNL12	<i>F. poae</i>	ITS	306
FSPO, f	FSPO, r	<i>F. sporotrichioides</i>	ITS	300
FuzOxF	FuzOxR	<i>F. oxysporum</i>	ITS	520
Fc01 f	Fc01 r	<i>F. culmorum</i>	ITS60	300
Fspor F1	lanspo R1	<i>F. sporotrichioides</i>	ITS60	332
JIaF	JIaR	<i>F. avenaceum</i> / <i>F. arthrosporioides</i>	JIA	220
F11f	F11r	<i>F. graminearum</i>	Fgr62	450

Рис. 1. Пример электрофореграммы продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *Fusarium langsethiae* (FSPOf/FSPWr)

Fig. 1. Example of an electrophoregram of PCR products with primers for determining the species *Fusarium langsethiae* (FSPOf/FSPWr)

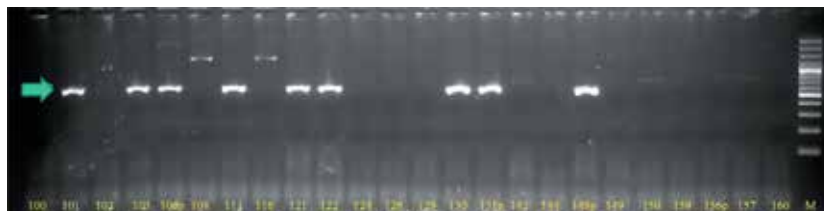


Рис. 2. Пример электрофоретического разделения продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *Fusarium poae* (IGS/CNL12)

Fig. 2. Example of electrophoretic separation of PCR products with primers for determining the type of *Fusarium poae* (IGS/CNL12)

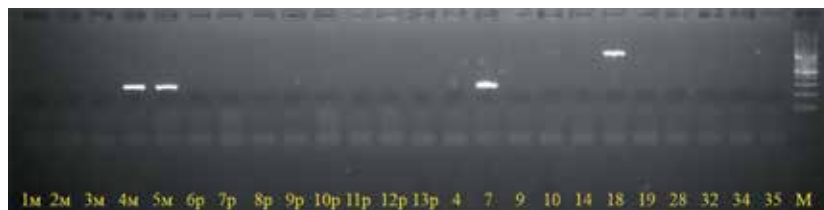


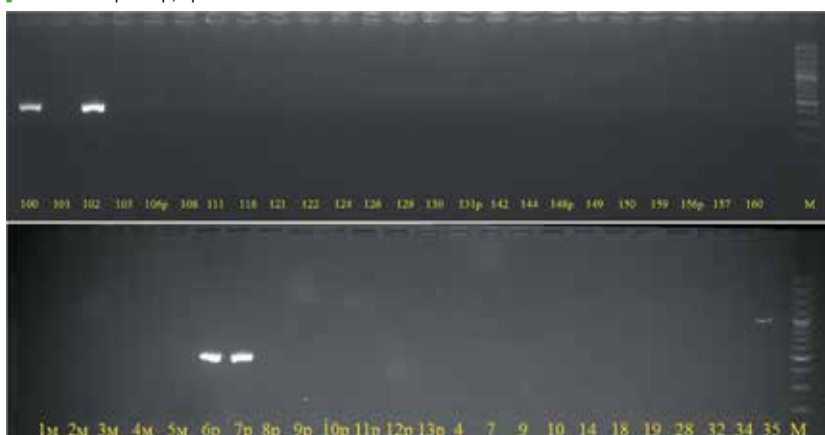
Рис. 3. Пример электрофоретического разделения продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *Fusarium sporotrichioides* (FsporF1/lanspoR1)

Fig. 3. Example of electrophoretic separation of PCR products with primers for determining the species *Fusarium sporotrichioides* (FsporF1/lanspoR1)



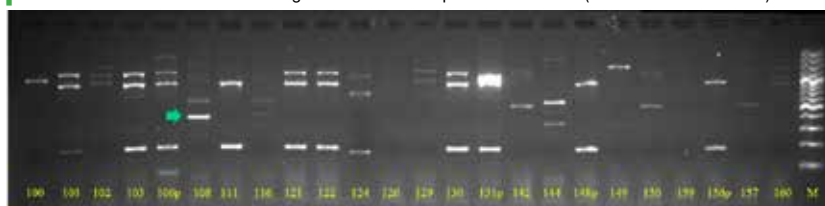
**Рис. 4.** Пример электрофоретического разделения продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *Fusarium oxysporum* (FuzOxF/FuzOxR). Маркерный фрагмент размером примерно 500 п.н. присутствует у образцов 6р, 7р

**Fig. 4.** Example of electrophoretic separation of PCR products with primers for determining the type of *Fusarium oxysporum* (FuzOxF/FuzOxR). A marker fragment of about 500 bp in size is present in samples 6p, 7p



**Рис. 5.** Пример электрофореграммы продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *Fusarium culmorum* (Fc01f/Fc01r). Ожидаемый размер маркерного фрагмента присутствовал у образца 108. М — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

**Fig. 5.** Example of an electrophoregram of PCR products with primers for determining the type of *Fusarium culmorum* (Fc01f/Fc01r). The expected size of the marker fragment was present in the sample 108. M — marker of molecular weight GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)



**Рис. 6.** Электрофореграммы продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *F. avenaceum* или *F. arthrosporidae* (JIAf/JIAr). Продукты амплификации отсутствуют. Ожидаемый размер маркерного фрагмента — 220 п.н. Образец 101 — положительный контроль *F. avenaceum*. М — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

**Fig. 6.** Electrophoregram of PCR products with primers for determining the species *F. avenaceum* or *F. arthrosporidae* (JIAf/JIAr). There are no amplification products. The expected size of the marker fragment is 220 bp. Sample 101 is a positive control of *F. avenaceum*. M — marker of molecular weight GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)



**Рис. 7.** Электрофореграммы продуктов ПЦР с праймерами для определения вида *F. graminearum* (F11f/F11r). Маркерный фрагмент ожидаемого размера (450 п.н.) отсутствует. М — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

**Fig. 7.** Electrophoregrams of PCR products with primers for determining the species *F. graminearum* (F11f / F11r). The marker fragment of the expected size (450 bp) is missing. M - molecular weight marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)



Scientific). IGS/CNL12 (*F. poae*) (рис. 2). Маркер работал корректно.

Маркерный фрагмент размером 306 п.н. присутствует у образцов 4м, 5м, 7. М — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). FsporF1/lanspoR1 (*F. sporotrichioides*) (рис. 3). Маркер работал корректно.

Маркерный фрагмент размером 332 п.н. присутствует у образца 124М — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). FuzOxF/FuzOxR (*F. oxysporum*) (рис. 4). Маркер работал корректно.

Положительный контроль — образец 102 и 100 — контрольный образец *F. solani*. М — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Fc01f/Fc01r (*F. culmorum*) (рис. 5). В целом наблюдалась амплификация довольно большого числа неспецифических продуктов. Ввиду отсутствия положительного контроля и трудности достоверной идентификации, лишь один из образцов был нами интерпретирован как *F. culmorum*.

JIAf/JIAr (*F. avenaceum* / *F. arthrosporidae*) (рис. 6).

С данной парой праймеров, несмотря на оптимизацию условий ПЦР, не удалось получить амплификацию ни с одним из образцов изучаемой коллекции. В том числе и с образцом 101, являющимся положительным контролем *F. avenaceum*. Таким образом, можно заключить, что данный маркер не сработал. Возможно, для идентификации данных видов следует использовать праймеры, предложенные другими авторами.

F11f/F11r (*F. graminearum*) (рис. 7). Амплификации с данной парой праймеров не было выявлено ни у одного образца исследуемой коллекции.

В таблице 2 приводятся данные по видовому определению исследуемых образцов на предмет выявления патогенна рода *Fusarium* с помощью молекулярных маркеров.

### Выводы

С помощью молекулярных STS-маркеров удалось провести дифференциацию образцов исследуемого пула коллекции. Относительно большое число образцов осталось не идентифицировано с помощью молекулярных маркеров. При проведении идентификации с помо-



Таблица 1. Обобщенные данные по видовому определению исследуемых образцов

Table 1. Generalized data on the species determination of the studied

№ образца	FSPOf/ FSPOr	FsporF1/lanspoR1	Fc01f/Fc01r	FSPOf/FSPOWr	IGS/CNL12	JIaf/JIAr	F11f/F11r	FuzOxf/FuzOxr
	<i>F.sporotrichioides</i>	<i>F.sporotrichioides</i>	<i>F.culmorum</i>	<i>F.langsethiae</i>	<i>F. poae</i>	<i>F.avenaceum</i>	<i>F.graminearum</i>	<i>F.oxysporum</i>
4м	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
5в	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
6р	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	да
7р	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	да
№4м	да	да	нет	нет	нет	нет	нет	нет
№7р	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
№40р	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
№47в	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
№53р	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
№66р	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
№68р	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет
100K	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	да
102K	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	да
108р	нет	нет	да	нет	нет	нет	нет	нет
124м	да	да	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Примечание: м — образец Московская область, р — образец Ростовская область, в — образец Воронежская область, К — контроли.

щью молекулярных маркеров рекомендуется использовать несколько маркеров различных авторов на один и тот же вид.

Среди коллекции с помощью молекулярных маркеров было выявлено 13 образцов (плюс один контрольный), условно отнесенных нами к *F. langsethiae*. Данные образцы были собраны как в Московской области, так и в Ростовской области.

Среди коллекции с помощью молекулярных маркеров было выявлено 2 образца (плюс два контрольных), отнесенных нами к *F. oxysporum*. Оба образца были отобраны в Ростовской области. Среди пула образцов коллекции, отобранных в Московской области, данный вид не встречался.

Среди коллекции с помощью молекулярных маркеров было выявлено 8 образцов, отнесенных нами к *F. poae*. Данные образцы были собраны как в Московской области, так и в Ростовской области.

Среди коллекции с помощью молекулярных маркеров было выявлено 2 образца, отнесенных нами к *F. sporotrichioides*. Оба образца были отобраны в Московской области. Среди пула образцов коллекции, отобранных в Ростовской области, данный вид не встречался.

Среди коллекции с помощью молекулярных маркеров было выявлен лишь 1 образец, отнесенный нами к *F. culmorum*. Данный образец был собран в Ростовской области.

Среди изучаемой коллекции образцов *Fusarium* на основе амплификации молекулярных маркеров виды

*F. oxysporum* и *F. culmorum* встречались только у образцов из Ростовской области, а вид *F. sporotrichioides* встречался только у образцов из Московской области. Однако следует подчеркнуть, что все три вида, по которым наблюдалось различие у двух изучаемых областей, были редко встречающимися.

В общей сложности у 36 образцов из коллекции не удалось идентифицировать видовую принадлежность с помощью молекулярных STS-маркеров.

Так же выявлено, что разнообразие почвенно-климатических условий в разных зонах ведет за собой смену видового состава представителей р. *Fusarium*; видовой состав грибов р. *Fusarium* существенно меняется в зависимости от агроклиматических условий. В более влажных и теплых условиях (южные регионы) доминируют специфические виды *F. culmorum*, *F. sporotrichiella*, *F. oxysporum*. Реже встречаются *F. heterosporum*, *F. nivale*; виды *F. graminearum* обитает на растительных остатках, на корнях растений или в зоне ризосферы, но практически не встречается в почве в чистом виде.

Также в ходе исследований на практике при работе над устойчивостью моркови столовой выявлен агрессивный штамм, который служил для создания и проведения ряда лабораторных опытов. В ходе селекционной работы разработана схема отбора устойчивых форм, направленная на ускорение и повышение эффективности различных методов иммунологической оценки и чередованием двухлетнего и однолетнего циклов развития растений моркови столовой.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шкаликов В.А., Белошапкина О.О., Букреев Д.Д., Горбачев И.В., Джалилов Ф.С.-У., Корсак И.В., Минаев В.Ю., Стройков Ю.М. Защита растений от болезней. М.: Колос, 2010. 404 с. [Shkalikov V. A., Beloshapkina O. O., Bukreev D. D., Gorbachev I. V., Jalilov F. S.-U., Korsak I. V., Minaev V. Yu., Stroikov Yu. M. Plant

protection from diseases. Moscow: Kolos, 2010. 404 p. (In Russ.)]  
2. Nazarov P.A., Baleev D.N., Ivanova M.I., Sokolova L.M., Karakozova M.V. Acta Naturae (английская версия). — ACTA NATURAE | Т. 12 № 3 (46) 2020. С.46-59. Инфекционные болезни растений: этиология, современное состояние, проблемы и перспективы защиты растений. [Nazarov P. A., Baleev D. N., Ivanova M. I., Sokolova L. M., Karakozova M. V. Acta Naturae

(English version). - ACTA NATURAE / Vol. 12 No. 3 (46) 2020. pp. 46-59. Infectious plant diseases: etiology, current state, problems and prospects of plant protection DOI: 10.32607/actanaturae.11026. (In Russ.)] DOI: 10.32607/actanaturae.11026

3. Соколова Л.М. Анализ видового разнообразия грибов из рода *Fusarium*. Аграрная наука. 2019. №S1. С.118-122 [Sokolova L. M. Analysis of the species diversity of fungi from the genus *Fusarium*. Agricultural science. 2019. No. S1. pp. 118-122. (In Russ.)] DOI: 10.32634/0869-8155-2019-326-1-118-122

4. Hussain F., Usman F. // Abiotic and Biotic Stress in Plants. London, UK: IntechOpen, 2019.

5. Geiser, D. M.; Jimenez-Gasco, M.; Kang, S.; Makalowska, I.; Veerara-ghavan, N.; Ward, T.J.; Zhang, N.; Kuldau, G.A. & O'Donnell, K. (2004). *Fusarium-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium*. European Journal of Plant Pathology, Vol.110, No.5-6, pp. 473-479, ISSN 0929-1873

6. Park, B.; Park, J.; Cheong K-C.; Choi, J.; Jung, K.; Kim, D.; Lee, Y.H.; Ward, T.J.; O'Donnell, K.; Geiser, D.M. & Kang, S. (2011). Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. Nucleic Acids Research Vol.39, Supplement. 1, pp. D640-D646, ISSN 0305-1048

7. Martinelli F., Scalenghe R., Davino S., Panno S., Scuderi G., Ruisi P., Villa P., Stroppiana D., Boschetti M., Goulart L.R., et al. // Agron. Sustain. Dev. 2015. V. 35. № 1. P. 1-25.

8. Derrick K.S. // Virology. 1973. V. 56. № 2. P. 652-653.

9. Salgado-Salazar C., Baughan G.R., Wallace E.C., Crouch J.A. // Plant Methods. 2018. V. 14. P. 92. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0362-z>

10. Anderson, I.C. & Cairney, J.W.G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental Microbiology, Vol.6, No. 8, pp. 769-779

11. Bilodeau, G.J.; Pelletier, G.; Pelletier, F.; L'vesque, C.A. & Hamelin, R.C. (2009). Multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. Canadian Journal of Plant Pathology, Vol.31, No.2, pp. 195-210, ISSN 0706-0661

12. Cruz-Perez, P.; Butner, M.P. & Stetzenbach, L. D. 2001. Detection and quantitation of *Aspergillus fumigatus* in pure culture using polymerase chain reaction. Molecular and Cellular Probes, Vol.15, No.2, pp. 81-88, ISSN 0890-8508

13. Demeke, T. & Jenkins, G.R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of bio-technology-derived traits. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol.396, No.6, pp. 1977-1990, ISSN 1618-2642;

14. Biswas, K. & Biswas, R.A. (2011). Modified method to isolate genomic DNA from plants without liquid nitrogen. Current Science, Vol.100, No.11, pp. 1622-1624, ISSN 0011-3891

15. Chi, M.-H.; Park, S.-Y. & Lee, Y.-H. (2009). A quick and safe method for fungal DNA extraction. Plant Pathology Journal, Vol.25, No.1, pp. 108-111, ISSN 1598-2254;

16. Feng, J.; Hwang, R.; Chang, K. F.; Hwang, S. F.; Strelkov, S. E.; Gossen, B. D. & Zhou, Q. (2010). An inexpensive method for extraction of genomic DNA from fungal mycelia. Canadian Journal of Plant Pathology, Vol.32, No.3, pp. 396-401, ISSN 0706-0661;

17. Cervantes-Diaz, L.; Grimaldo-Juarez, O. & Alarcon, A. (2010). A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genet-ics and Molecular Research, Vol.9, No.1, pp. 162-166, ISSN 1676-5680

18. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. 1979. T. 76. № 10. С. 5269-5273;

19. Zelaya-Molina L.X.; Ortega M.A. & Dorrance A.E. (2011). Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. Biotechnology Letters, Vol.33, No.4, pp. 715-720, ISSN 0141-5492;

20. Zhang, Y.J.; Zhang, S.; Liu, X.Z.; Wen, H.A. & Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. Letters in Applied Microbiology, Vol.51, No.1, pp. 114-118, ISSN 0266-8254;

21. Hirsch, P.R.; Mauchline, T.H. & Clark, I.M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. Soil Biology & Biochemistry, Vol.42, pp. 878-887, ISSN 0038-0717

22. Поликсенова, В.Д. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология» / В.Д. Поликсенова, А.К. Храмцов, С.Г. Пискун / Методы экспериментального изучения микроскопических грибов». Минск, БГУ. 2004. 36 с. [Poliksenova, V. D. Methodological guidelines for special practice classes in the section "Mycology" / V. D. Poliksenova, A. K. Khrantsov, S. G. Piskun / Methods of experimental study of microscopic fungi". Minsk, BSU. 2004. 36 s. (In Russ.)]

23. Соколова Л.М., Егорова А.А., Терешонкова Т.А., Алексеева К.Л., Ускоренный метод выделения в чистую культуру и характеристика грибов р. *Fusarium*, поражающих морковь столовую. Селекция и семеноводство овощных культур ВНИИССОК, 2014. № 45. С. 496-501. [Sokolova L. M., Egorova A. A., Tereshonkova T. A., Alekseeva K. L., Accelerated method of isolation into pure culture and characteristics of *Fusarium* fungi affecting table carrots. Selection and seed production of vegetable crops VNIISOK. 2014. No. 45. pp. 496-501 (In Russ.)]

24. Леунов В.И., Ховрин А.Н., Терешонкова Т.А., Соколова Л.М., Горшкова Н.С., Алексеева К.Л. Методы ускоренной селекции моркови столовой на комплексную устойчивость к грибным болезням (ALTERNARIA и FUSARIUM). Методические рекомендации / Ответственный за выпуск И.И.Тарасенков. Москва, 2011. [Leunov V. I., Khovrin A. N., Tereshonkova T. A., Sokolova L. M., Gorshkova N. S., Alekseeva K. L. Methods of accelerated selection of carrots for complex resistance to fungal diseases (ALTERNARIA and FUSARIUM). Methodological recommendations / Responsible for the issue I. I. Tarasenkova. Moscow, 2011. (In Russ.)]

25. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. Пер. с англ.-М.: Мир, 2001.-486 с. [Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. Determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Trans. from English-M.: Mir, 2001. -486 p. (In Russ.)]

26. Егорова, А.А., Соколова Л.М. Получение моноспоровой культуры р. *Fusarium* на моркови столовой *Daucus carota* L. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2017. №9(155). С. 115-119. [Egorova, A. A., Sokolova L. M. Obtaining a monospore culture of *r. Fusarium* on table carrots *Daucus carota* L. Bulletin of the Altai State Agrarian University. 2017. No. 9(155). pp. 115-119. (In Russ.)]

27. Семенов А.Н., Дивашук М.Г., Баженов М.С., Карлов Г.И., Леунов В.И., Ховрин А.Н., Егорова А.А., Соколова Л.М., Терешонкова Т.А., Алексеева К.Л., Леунова В.М. Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров у ряда видов рода *FUSARIUM*. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2016. №1. С. 40-50. [Semenov A. N., Divashuk M. G., Bazhenov M. S., Karlov G. I., Leunov V. I., Khovrin A. N., Egorova A. A., Sokolova L. M., Tereshonkova T. A., Alekseeva K. L., Leunova V. M. Comparative analysis of polymorphism of microsatellite markers in a number of species of the genus *FUSARIUM*. News of the Timiryazev Agricultural Academy. 2016. No. 1. pp. 40-50. (In Russ.)]

## REFERENCES

1. Shkalikov V. A., Beloshapkina O. O., Bukreev D. D., Gorbachev I. V., Jalilov F. S.-U., Korsak I. V., Minaev V. Yu., Stroikov Yu. M. Plant protection from diseases. Moscow: Kolos, 2010. 404 p.

2. Nazarov P. A., Baleev D. N., Ivanova M. I., Sokolova L. M., Karakozova M. V. Acta Naturae (English version). - ACTA NATURAE / Vol. 12 No. 3 (46) 2020. pp. 46-59. Infectious plant diseases: etiology, current state, problems and prospects of plant protection DOI: 10.32607/actanaturae.11026.

3. Sokolova L. M. Analysis of the species diversity of fungi from the genus *Fusarium*. Agricultural science. 2019. No. S1. pp. 118-122.

4. Hussain F., Usman F. // Abiotic and Biotic Stress in Plants. London, UK: IntechOpen, 2019.

5. Geiser, D. M.; Jimenez-Gasco, M.; Kang, S.; Makalowska,

I.; Veerara-ghavan, N.; Ward, T. J.; Zhang, N.; Kuldau, G. A. & O'Donnell, K. (2004). *Fusarium-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium*. European Journal of Plant Pathology, Vol.110, No.5-6, pp. 473-479, ISSN 0929-1873

6. Park, B.; Park, J.; Cheong K-C.; Choi, J.; Jung, K.; Kim, D.; Lee, Y.H.; Ward, T.J.; O'Donnell, K.; Geiser, D.M. & Kang, S. (2011). Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. Nucleic Acids Research Vol.39, Supplement. 1, pp. D640-D646, ISSN 0305-1048

7. Martinelli F., Scalenghe R., Davino S., Panno S., Scuderi G., Ruisi P., Villa P., Stroppiana D., Boschetti M., Goulart L.R., et al. // Agron. Sustain. Dev. 2015. V. 35. № 1. P. 1-25.

8. Derrick K.S. // Virology. 1973. V. 56. No. 2. P. 652-653.

9. Salgado-Salazar C., Baughan G. R., Wallace E. C., Crouch J. A. // Plant-methods. 2018. V. 14. P. 92. <https://doi.org/10.1186/>

s13007-018-0362-z

10. Anderson, I.C. & Cairney, J.W.G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, Vol.6, No. 8, pp. 769–779
11. Bilodeau, G. J.; Pelletier, G.; Pelletier, F.; Lyvesque, C. A. & Hamelin, R. C. (2009). Multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol.31, No.2, pp. 195-210, ISSN 0706-0661
12. Cruz-Perez, P.; Buttner, M.P. & Stetzenbach, L. D. 2001. Detection and quantitation of *Aspergillus fumigatus* in pure culture using polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, Vol.15, No.2, pp. 81-88, ISSN 0890-8508
13. Demeke, T. & Jenkins, G.R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of bio-technology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol.396, No.6, pp. 1977–1990, ISSN 1618-2642;
14. Biswas, K. & Biswas, R.A. (2011). Modified method to isolate genomic DNA from plants without liquid nitrogen. *Current Science*, Vol.100, No.11, pp. 1622-1624, ISSN 0011-3891
15. Chi, M.-H.; Park, S.-Y. & Lee, Y.-H. (2009). A quick and safe method for fungal DNA extraction. *Plant Pathology Journal*, Vol.25, No.1, pp. 108-111, ISSN 1598-2254;
16. Feng, J.; Hwang, R.; Chang, K. F.; Hwang, S. F.; Strelkov, S. E.; Gossen, B. D. & Zhou, Q. (2010). An inexpensive method for extraction of genomic DNA from fungal mycelia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol.32, No.3, pp. 396-401, ISSN 0706-0661;
17. Cervantes-Diaz, L.; Grimaldo-Juarez, O. & Alarcon, A. (2010). A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research*, Vol.9, No.1, pp. 162-166, ISSN 1676-5680
18. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979. Vol. 76. No. 10. pp. 5269-5273;
19. Zelaya-Molina L.X.; Ortega M.A. & Dorrance A.E. (2011).

#### ОБ АВТОРАХ:

**Соколова Любовь Михайловна**, ведущий научный сотрудник отдела селекции и семеноводства, кандидат сельскохозяйственных наук

**Егорова Анна Анатольевна**, старший научный сотрудник отдела селекции и семеноводства, кандидат сельскохозяйственных наук

**Ховрин Александр Николаевич**, главный научный сотрудник, заведующий отделом селекции и семеноводства, доцент, кандидат сельскохозяйственных наук

Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnology Letters*, Vol.33, No.4, pp. 715-720, ISSN 0141-5492;

20. Zhang, Y.J.; Zhang, S.; Liu, X.Z.; Wen, H.A. & Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.51, No.1, pp. 114-118, ISSN 0266-8254;
21. Hirsch, P.R.; Mauchline, T.H. & Clark, I.M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol.42, pp. 878- 887, ISSN 0038-0717
22. Poliksenova, V. D. Methodological guidelines for special practice classes in the section "Mycology" / V. D. Poliksenova, A. K. Khramtsov, S. G. Piskun / Methods of experimental study of microscopic fungi". Minsk, BSU. 2004. 36 s
23. Sokolova L. M., Egorova A. A., Tereshonkova T. A., Alekseeva K. L., Accelerated method of isolation into pure culture and characteristics of *P. Fusarium* fungi affecting table carrots Selection and seed production of vegetable crops VNIISOK 2014 No. 45. pp. 496-501
24. Leunov V. I., Khovrin A. N., Tereshonkova T. A., Sokolova L. M., Gorshkova N. S., Alekseeva K. L. Methods of accelerated selection of carrots for complex resistance to fungal diseases (*ALTERNARIA* and *FUSARIUM*). Methodological recommendations / Responsible for the issue I. I. Tarasenkova. Moscow, 2011.
25. Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. Determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. *Trans. from English-M.: Mir*, 2001. -486 p.
26. Egorova, A. A., Sokolova L. M. Obtaining a monospore culture of *R. Fusarium* on table carrots *Daucus carota* L. *Bulletin of the Altai State Agrarian University*. 2017. No. 9(155). pp. 115-119.
27. Semenov A. N., Divashchuk M. G., Bazhenov M. S., Karlov G. I., Leunov V. I., Khovrin A. N., Egorova A. A., Sokolova L. M., Tereshonkova T. A., Alekseeva K. L., Leunova V. M. Comparative analysis of polymorphism of microsatellite markers in a number of species of the genus *FUSARIUM*. *News of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2016. No. 1. pp. 40-50.

#### ABOUT THE AUTHORS:

**Sokolova Lyubov Mihajlovna**, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Researcher of the Breeding and Seed Production Department

**Egorova Anna Anatolevna**, Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher of the Breeding and Seed Production Department

**Hovrin Aleksandr Nikolaevich**, Candidate of Agricultural Sciences, Docent, Chief Researcher, Head of the Breeding and Seed Production Department

## НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •

### Российские физики научились недорого отыскивать яд в фруктах

Речь идет о тиабендазоле, пищевой добавки E233, которую производители могут использовать для сохранения свежести фруктов и ягод. Ее использование предотвращает появление плесени на плодах. В России использование E233 запрещено.

Как сообщает sfera.fm, ученые Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» при поддержке коллег из Турции, Ирана и Саудовской Аравии разработали простой и экономичный способ нахождения в фруктах тиабендазола. Средство может быть обнаружено даже если его концентрация незначительна. Итоги научной работы опубликованы в научном издании ScienceDirect.

В задачу ученых входило найти такой состав раствора, который мог бы найти следы средства, даже в незначительных долях. Используя большое количество сочетаний, ученые нашли необходимый молекулярный комплекс на основе бетаина и пирослизеовой кислоты, который обнаруживает тиабендазол в плодах, соединяется с ним и «подсвечивает» его содержание.

Ранее для поиска вещества задействовали дорогостоящие методы анализа. Их использования требовало наличие специального оборудования. Такой способ могла себе позволить не каждая лаборатория.

Каждая страна устанавливает свою допустимую норму содержания вещества в фруктах. Но в среднем составляют 5 мг на литр. Способ, предложенный российскими учеными, может показать содержание тиабендазола в 50 раз меньше стандартной нормы.