

**Исабек А.У.¹, Тайлакова Э.Т.², Кожабегенов Н.С.³,
Строчков В.М.⁴, Султанкулова К.Т.⁵, Рсалиев А.С.⁶**

¹e-mail: isabekova__aisha@mail.ru, ²e-mail: tailakova_86@mail.ru, ³e-mail: nurlanks@gmail.com,

⁴e-mail: vstrochkov@mail.ru, ⁵e-mail: sultankul70@mail.ru, ⁶e-mail: aralbek@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
Казахстан, пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *PYRENOPHORA TRITICI-REPENSIS*

В последние годы наблюдается заметное расширение ареала и вредоносности желтой пятнистости листьев в Казахстане. Широкому распространению и повышенной вредоносности патогена способствует высокая адаптивная способность гриба. Идентифицировать вид гриба по симптомам проявления болезни на листьях растений и по морфологическим признакам конидий довольно сложно. Создание отечественных диагностических средств для выявления возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repensis* является актуальной задачей. Среди молекулярных методов наиболее удобным и оперативным является метод ПЦР диагностики. ПЦР позволяет обнаруживать грибковую ДНК еще до того, как физиологические симптомы становятся видимыми на растительной ткани. Целью данной работы является разработка ПЦР тест-системы для диагностики желтой пятнистости пшеницы.

В результате проведенных исследований, были подобраны и синтезированы видоспецифичные праймеры для выявления возбудителя желтой пятнистости пшеницы, оптимизированы условия постановки ПЦР: состав реакционной смеси и температурно-временной режим. Определена специфичность и чувствительность тест-системы. Разработанная тест-система показала довольно высокую специфичность и позволяет выявлять нуклеиновую кислоту патогена в исследуемых образцах в количестве 2,6 пг. Данная тест-система может быть использована для оперативного обнаружения ДНК патогена в пробах.

Ключевые слова: желтая пятнистость, ПЦР, специфичность, чувствительность, диагностика.

**Isabek A.U.¹, Tajlakova Je.T.², Kozhabergenov N.S.³,
Strochkov V.M.⁴, Sultankulova K.T.⁵, Rsaliev A.S.⁶**

¹e-mail: isabekova__aisha@mail.ru, ²e-mail: tailakova_86@mail.ru, ³e-mail: nurlanks@gmail.com,

⁴e-mail: vstrochkov@mail.ru, ⁵e-mail: sultankul70@mail.ru, ⁶e-mail: aralbek@mail.ru

The Republican Government Enterprise on the basis of economic control rights «Research Institute for Biological Safety Problems» of the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan

Development of pcr test system for *Pyrenophora tritici-repensis* detection

In recent years, there has been a noticeable expansion of the range and severity of the tan spot in Kazakhstan. The high adaptive ability of the fungus contributes to the wide spread and increased harmfulness of the pathogen. It is quite difficult to identify the species of fungus by the symptoms of the manifestation of the disease on the leaves of plants and by the morphological features of conidia. The creation of domestic diagnostic tools to identify the causative agent of wheat tan spot *Pyrenophora tritici-repensis* is an urgent task. Among molecular methods, the most convenient and operational method is PCR diagnostics. PCR makes it possible to detect fungal DNA even before physiological symptoms become visible on plant tissue.

The aim of this work is to develop a PCR test system for the diagnosis of wheat tan spot. As a result of the studies, species-specific primers were selected and synthesized to identify the causative agent of wheat tan spot, the conditions for PCR formulation were optimized: the composition of the reaction mixture and the temperature and time regime. The specificity and sensitivity of the test system was determined. The developed test system showed rather high specificity and allows detection of the pathogen nucleic acid in the samples under study in the amount of 2,6 pg. This test system can be used for the rapid detection of pathogen DNA in samples.

Key words: tan spot, PCR, specificity, sensitivity, diagnosis.

Исабек А.У.¹, Тайлакова Э.Т.², Кожабергенов Н.С.³,
Строчков В.М.⁴, Султанкулова К.Т.⁵, Рсалиев А.С.⁶

¹e-mail: isabekova_aisha@mail.ru, ²e-mail: tailakova_86@mail.ru, ³e-mail: nurlanks@gmail.com,

⁴e-mail: vstrochkov@mail.ru, ⁵e-mail: sultankul70@mail.ru, ⁶e-mail: aralbek@mail.ru

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитеті «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» Республикалық мемлекеттік кәсіпорны

***Pyrenophora tritici-repentis* анықтауға арналған**

ПТР сынақ-жүйесін құру

Соңғы жылдары Қазақстанда бидайдың жапырақ дағы зияндылығының кеңеюі байқалады. Аурудың кең таралуына және зияндылығына саңырауқұлақтың жоғары бейімделу қабілеті ықпал етеді. Өсімдіктің жапырақтары мен конидияның морфологиялық ерекшеліктері арқылы аурудың көрініс белгілері бойынша саңырауқұлақтардың түрін анықтау өте қиын. Бидайдың жапырақ дағы *Pyrenophora tritici-repentis* қоздырғышын анықтауға арналған отандық баламалау құралдарын құру – бұл өзекті мәселе. Молекулярлық әдістердің арасында ПТР – ең қолайлы және тиімді болып табылады. ПТР өсімдік тініне физиологиялық белгілері пайда болғанға дейін, саңырауқұлақтың ДНҚ-ын анықтауға мүмкіндік береді. Бұл жұмыстың мақсаты бидайдың жапырақ дағын баламалау үшін ПТР сынақ-жүйесін құру болып табылады.

Зерттеулер нәтижесінде, бидай жапырақ дағының қоздырғышын анықтау үшін түрге тән праймерлер іріктеліп, синтезделді. ПТР шарттары: реакциялық қоспаның құрамы және температура мен уақыт режимі оңтайландырылды. Өзірленген сынақ-жүйесі жоғары ерекшелік көрсетті және зерттелген үлгілерде 2,6 пг мөлшерінде патогеннің нуклеин қышқылын анықтауға мүмкіндік береді. Бұл сынақ жүйесі арқылы сынамалардағы патогенді ДНҚ-ны жылдам анықтауға болады.

Түйін сөздер: бидайдың жапырақ дағы, ПТР, ерекшелігі, сезімталдық, баламалау.

Введение

Желтая пятнистость (пиренофороз) – является экономически значимым заболеванием пшеницы, которое приводит к значительным потерям урожая. Возбудителем желтой пятнистости является аскомицет *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Dresch. (син. *Dreschlera tritici-repentis* (Died.) Snheomaker) [1-3].

В настоящее время желтая пятнистость широко распространена во многих странах, в том числе в Центральной Азии, Северной Европы, Австралии и Северной Америки чему способствовали биологические особенности патогена, восприимчивость возделываемых сортов пшеницы и современная агротехника [4-10].

В Казахстане желтая пятнистость заняла доминирующее положение среди листовых болезней пшеницы сравнительно недавно. Патоген часто развивается в комплексе с септориозом как в предгорной зоне южного и юго-восточного регионов, так и в степной зоне северного региона в годы с повышенным количеством осадков. В период 2000-2016 годы 5 раз происходили локальные вспышки желтой пятнистости и септориоза или обширные их эпифитотии. При этом потери урожая пшеницы составляли в среднем 15-20 %, а при раннем их проявлении до 30-40 %. Причинами развития болезни в Казахстане являются

минимальная обработка почвы с сохранением стерни, монокультура пшеницы и возделывание неустойчивых к патогену сортов [11, 12].

Несмотря на масштабные усилия ученых и очевидный прогресс в изучении желтой пятнистости листьев, существует ряд нерешенных проблем. Остается сложным идентификация вида гриба по симптомам проявления болезни на листьях растений и по морфологическим признакам конидий. Следовательно, в полевых условиях симптомы желтой пятнистости нелегко отделить от видов септориоза (*Parastagonospora nodorum*, *Zymoseptoria tritici*), внешние признаки которых почти одинаковы, а причины их возникновения и возбудители различны [13, 14].

В связи с этим для точного определения болезни, кроме внешнего осмотра пораженного растения, необходимы специальные исследования с целью установления возбудителя. В большинстве случаев внешние признаки заболевания дополняются микроскопическими исследованиями и морфологическими данными [15]. В отдельных случаях применяются молекулярно-генетические методы. Благодаря высокой чувствительности, специфичности метод ПЦР приобретает приоритетный статус в молекулярной диагностике. ПЦР позволяет обнаруживать грибковую ДНК еще до того, как физиологические симптомы становятся видимыми на

растительной ткани [16-19]. К настоящему времени для молекулярной идентификации *P. tritici-repentis* были разработаны несколько ПЦР тест-систем, основанные на использовании видоспецифичных праймеров [9, 13]. Кроме того, были разработаны методы диагностики изолятов патогена на основе дуплексной ПЦР в реальном времени, позволяющие одновременно дифференцировать два вида пятнистости листьев *P. tritici-repentis* и *P. nodorum* с помощью одной реакции [14]. В связи с распространением желтой пятнистости в Казахстане создание отечественного, специфичного и чувствительного теста, не требующего большого количества времени на проведения, является актуальной задачей для нашей страны.

Целью данной работы является разработка ПЦР тест-системы для диагностики желтой пятнистости пшеницы.

Материалы и методы исследования

Создание тест-системы состоит из нескольких этапов таких как, выделение чистой культуры возбудителя, подбор и синтез специфичных праймеров, выделение ДНК, оптимизация состава реакционной смеси и температурно-временного режима, определение специфичности и чувствительности тест-системы.

Выделение чистой культуры Pyrenophora tritici-repentis

Для получения чистой культуры *Pyrenophora tritici-repentis* заранее стерилизованные пораженные сегменты листьев раскладывают на поверхность КДА (картофельно-декстрозный агар/стрептомицина сульфат 50 мг/л) с дальнейшим инкубированием на светоустановке при температуре 20-26 °C [15, 16].

Синтез праймеров и выделение ДНК грибов

Синтез олигонуклеотидных праймеров проводили на автоматическом синтезаторе фирмы K&A Laborgeraete, модели DNA/RNA Synthesizer H-16 (производство Германии), амидофосфитным методом согласно инструкции производителя.

Выделение ДНК проводили набором GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя.

Оптимизация ПЦР

Работы по оптимизации параметров ПЦР-реакции проводились с использованием градиентных амплификаторов Master cycler ProS («Eppendorf», Германия) и SimpliAmp Thermal Cycler («Applied Biosystems», США).

Результаты амплификации выявляли с помощью метода геле электрофореза. Электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле в буфере TAE (40 mM трисгидроксиметиламинометан, 20 mM ледяная уксусная кислота, 1 mM ЭДТА), с добавлением 0.5 мкг/мл бромистого этидия. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК 1 kb Invitrogen.

Секвенирование ДНК грибов

Секвенирование фрагментов амплификации выполняли методом секвенирования по Сэнгеру с набором ABI PRISM BigDye Terminator v 3.1 («Applied Biosystems», США), согласно инструкции изготовителя с использованием 16-капиллярного генетического анализатора 3130XL Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Сборку и анализ полученных в результате секвенирования последовательностей проводили с использованием программы Sequencher v. 5.4.1.

Результаты и обсуждение

Для идентификации грибов на уровне рода и вида использовали праймеры, которые специфичны внутренним транскрибируемым спейсерам (ITS). Эти участки грибкового генома окружают 5.8S-кодирующую последовательность и расположены между генами 18S (SSU) и 28S (LSU). Область ITS очень стабильна, присутствует в нескольких экземплярах и обычно консервативна [17-19]. Универсальные праймеры, предназначенные для связывания высококонсервативных областей, позволяют амплифицировать переменные фрагменты ДНК, которые позволяют идентифицировать их на основе последовательности ДНК или рестрикционного анализа ампликонов [20-22]. В настоящее время, если 2 последовательности ITS отличаются менее чем на 3%, считается, что они происходят от одного и того же вида. Кроме того, области ITS содержат уникальные последовательности, позволяющие создавать пары праймеров, специфически нацеленные на отдельные виды [23].

Для подбора праймеров, был проведен поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген β -тубулина и ITS в международной базе данных GenBank. Были отобраны последовательности для гриба *Pyrenophora tritici-repentis*. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и подбор специфических праймеров проводили с использованием программы CLC Genomics Workbench v.11.0.1 (QIAGEN).

На основании выравненных последовательностей, проводили подбор специфических праймеров.

Подобранные праймеры были проверены на специфичность с использованием программы BLAST. Для дальнейших работ были выбраны

праймеры, показывающие 100 % специфичность с соответствующим возбудителем. Таким образом, были отобраны пара праймеров на участок ITS и пара праймеров на ген β -тубулина. Характеристика подобранных праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика подобранных и синтезированных праймеров

Название праймера	Последовательность 5' – 3'	T _m (°C)	% GC	Размер ПЦР-продукта
PTR222F	CAGCGTCAGCAAAACAAA	57,8	44	159 п.о.
PTR380R	GAATACCAAAGGGCGCAA	57,4	50	

Видовую идентичность, выделенной ДНК, подтверждали с помощью секвенирования. Для этого проводили наработку ПЦР-продукта с использованием универсальных праймеров на ITS регион (ITS-4 – TCCTCCGCTTATTGATATGC и ITS-5 – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) [22]. Полученный ПЦР-продукт секвенировали на 16-капиллярном секвенаторе 3130xl Genetic Analyzer.

Полученные, в ходе секвенирования, нуклеотидные последовательности сравнивали с по-

мощью программы BLAST с последовательностями, размещёнными в международном банке генов GenBank. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 1.

Рисунок 1, показывает 100% идентичность региона ITS выделенной ДНК и последовательностями региона ITS *Pyrenophora tritici-repentis*, размещёнными в международном банке генов GenBank. Следовательно, можно сделать вывод, что полученная в ходе исследования культура является монокультурой *Pyrenophora tritici-repentis*.

Pyrenophora tritici-repentis strain SMCD 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; intern	976	976	100%	0.0	100.00%	FJ907535.1
Pyrenophora tritici-repentis partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 28	976	976	100%	0.0	100.00%	AM887493.1
Pyrenophora tritici-repentis isolate SO3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr	976	976	100%	0.0	100.00%	EF452491.1
Pyrenophora tritici-repentis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp	976	976	100%	0.0	100.00%	EF452484.1
Pyrenophora tritici-repentis isolate 10692 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	976	976	100%	0.0	100.00%	EF452475.1
Pyrenophora tritici-repentis isolate 128 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra	976	976	100%	0.0	100.00%	EF452476.1
Pyrenophora tritici-repentis partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 28	972	972	100%	0.0	99.81%	AM887509.1
Pyrenophora tritici-repentis isolate MF-2D 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	972	972	100%	0.0	99.81%	EF452487.1
Pyrenophora tritici-repentis strain V1EF11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	970	970	100%	0.0	99.81%	KT692571.1
Uncultured fungus clone L049479D01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra	970	970	100%	0.0	99.81%	JX136050.1
Uncultured fungus clone LX042233-122-012-C06 internal transcribed spacer 1, partial sequenc	970	970	100%	0.0	99.81%	GQ999403.1
Uncultured endophytic fungus clone 66-13-02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inte	970	970	100%	0.0	99.81%	EF505621.1
Pyrenophora tritici-repentis partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 28	970	970	100%	0.0	99.81%	AM887495.1

Рисунок 1 – Сравнительный анализ ДНК, выделенной из *Pyrenophora tritici-repentis*

Были проведены работы по определению специфичности тест-системы. Есть несколько факторов влияющих на специфичность метода ПЦР, такие как, температура отжига праймеров, концентрация ионов магния в реакционной смеси; концентрация буфера. Одним из важнейших аспектов реакции амплификации является подбор соответствующей температуры гибридизации праймера с ДНК. Оптимальной следует считать температуру, при которой

образуется максимальное количество продукта ПЦР без появления неспецифических полос на электрофореграмме. Для амплификации в условиях не полностью комплементарных последовательностей праймера и матричной ДНК необходимо увеличивать концентрацию ионов магния. Увеличение концентрации ионов магния оказывает очень резкое влияние на специфичность и эффективность ПЦР. Это особенно важно в первых четырех циклах, в

дальнейшем амплифицируются вновь синтезированные продукты, которые содержат концевые последовательности, полностью комплементарные праймеру. Также в некоторых случаях на специфичность реакции может влиять концентрация буфера для ПЦР. Высокое значение концентрации буфера может уве-

личивать специфичность реакции [24, 25]. Для определения специфичности было проведен ряд работ, в которых изучали разные факторы, влияющие на специфичность реакции. Состав реакционной смеси и температурно-временной режим для определения специфичности реакции отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры ПЦР для определения специфичности

Факторы, влияющие на специфичность	Буфер для ПЦР	Ионы магния	Температура отжига
Состав реакционной смеси (общий объем 50 мкл)	10x буфер-10 мкл 0,2 mM дНТФ 2 mM Mg ²⁺ 400 nM каждого праймера 2 ед. фермента ДНК 10 нг	10x буфер-5,0 мкл 0,2 mM дНТФ 1,5 mM Mg ²⁺ 400 nM каждого праймера 2 ед. фермента ДНК 10 нг	10x буфер-5,0 мкл 0,2 mM дНТФ 2 mM Mg ²⁺ 400 nM каждого праймера 2 ед. фермента ДНК 10 нг
Температурно-временной режим	94 °С –3м (1 цикл) 94 °С –30 с 50 °С – 45 с (35 циклов) 72 °С –1м 30с 72 °С –7м (1 цикл)	94 °С –3м (1 цикл) 94 °С –30 с 50 °С – 45 с (35 циклов) 72 °С –1м 30с 72 °С –7м (1 цикл)	94 °С –3м (1 цикл) 94 °С –30 с 50 °С – гр. тем (35 циклов) 72 °С –1м 30с циклов) 72 °С –7м (1 цикл)
Примечание: гр.тем- градиент температуры: 47,6°С; 50,6°С; 53,6°С; 56,6°С.			

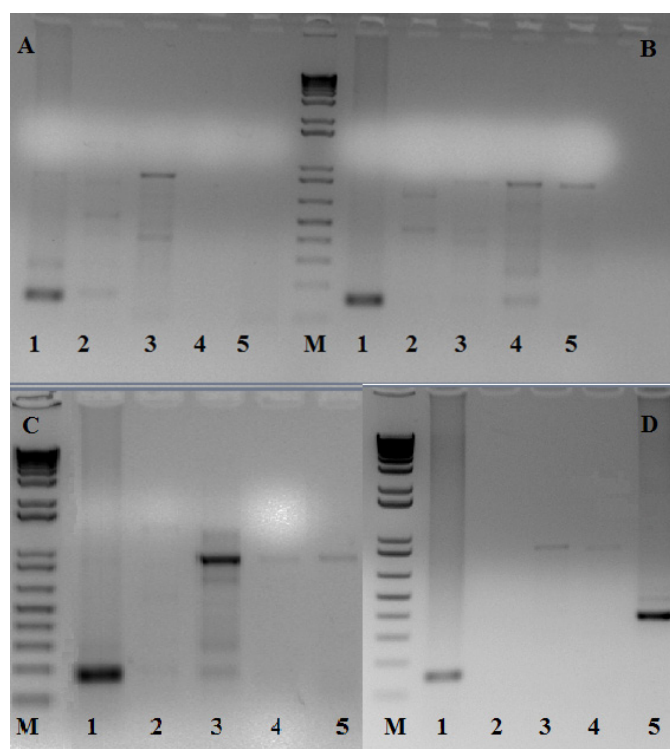


Рисунок 2 – Результаты определения специфичности

А – температура отжига праймеров 47,6°С; В – температура отжига праймеров 50,6°С;

С – температура отжига праймеров 53,6°С; D – температура отжига праймеров 56,6°С.

М – маркер молекулярного веса; 1 – ДНК *Pyrenophora tritici-repensis*; 2 – ДНК *Parastagonophora nodorum*; 3 – ДНК *Zymoseptoria tritici*; 4 – ДНК *Alternaria alternata*; 5 – ДНК *Fusarium graminearum*

При изучении специфичности реакции были выбраны ДНК других патогенов, которые часто сопутствуют с *Pyrenophora tritici-repensis* такие как, *Parastagonophora nodorum*, *Zyloseptoria tritici*, *Alternaria alternata*, *Fusarium gra-*

minearum. Полученные экспериментальные данные при постановке градиентной ПЦР показали, что во всех пробах нарабатываются неспецифические продукты реакции разных размеров (рисунок 2).

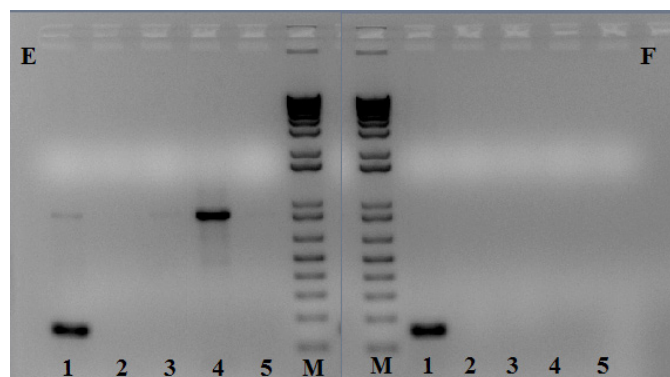


Рисунок 3 – Результаты определения специфичности

Е – уменьшение концентрации ионов магния;

Ф – двукратное увеличение концентрации буфера. М – маркер молекулярного веса;

1 – ДНК *Pyrenophora tritici-repensis*; 2 – ДНК *Parastagonophora nodorum*;

3 – ДНК *Zyloseptoria tritici*; 4 – ДНК *Alternaria alternata*; 5 – ДНК *Fusarium graminearum*

Согласно рисунку 3, при определении специфичности метода диагностики желтой пятнистости листьев пшеницы было установлено, что при увеличении концентрации буфера для ПЦР не синтезируются неспецифические продукты ПЦР. При уменьшении ионов магния наблюдается амплификация неспецифических ПЦР-продуктов разных размеров.

Также нами были проведены работы по определению чувствительности. Определение чувствительности проводили при следую-

щих температурных условиях: 94°C – 3 мин (1 цикл); 94 °С – 30 с, 50 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин 30 с (35 циклов), 72 °С – 7 мин (1 цикл). Реакцию амплификации проводили в 50 мкл смеси. Состав реакционной смеси: 10x буфер-10 мкл; 0,2 mM дНТФ; 2 mM Mg²⁺; 400 nM каждого праймера; фермент – 2 ед. ДНК с концентрацией 26 нг/мкл разводили стерильной свободной от нуклеаз водой в соотношении 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10 000; 1:100 000; 1: 1 000 000; 1: 10 000 000 (ДНК: вода).

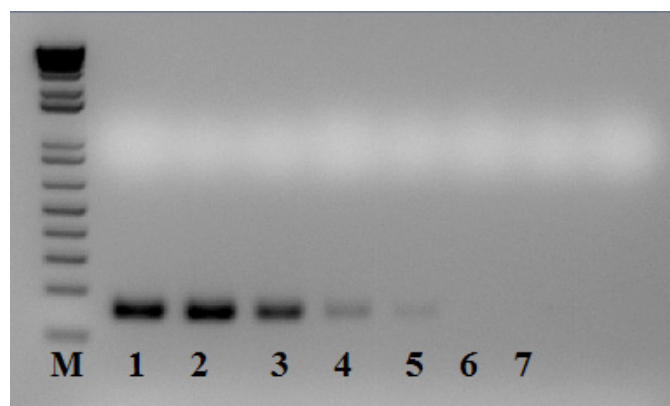


Рисунок 4 – Результаты определения чувствительности

М-маркер молекулярного веса; 1- ДНК 26*10³ пг; 2 – ДНК 26*10² пг; 3 – ДНК 260 пг;

4 – ДНК 26 пг; 5 – ДНК 2,6 пг; 6 – ДНК 0,26 пг; 7 – ДНК 0,026 пг.

При определении чувствительности разработанной ПЦР для обнаружения ДНК *Pyrenophora tritici-repentis* использовали десятикратные разведения ДНК патогена (от 26 нг до 0,026 пг). Результаты представлены на рисунке 4. Как показали исследования, порог чувствительности метода ПЦР составляет 2,6 пг ДНК патогена в пробе, это говорит о том, что отработанный метод ПЦР обладает высокой чувствительностью.

Ежегодно на рынке появляются десятки новых тест-систем для ПЦР анализа, предназначенных как для выявления нуклеотидных последовательностей различных микроорганизмов – возбудителей заболеваний, так и для исследования генов. Себестоимость ПЦР-анализа неуклонно снижается, что способствует все более широкому использованию метода в диагностических учреждениях. Применение метода ПЦР и различных его модификаций для диагностики заболеваний имеет ряд преимуществ – прямое определение ДНК возбудителя, высокая специфичность, высокая чувствительность, универсальность процедуры, простота и удобство проведения анализа, сравнительно небольшие затраты времени на проведение анализа. Таким образом, ПЦР тест-система для детекции ДНК возбудителя желтой пятнистости пшеницы позволит поставить диагноз в короткие сроки, включая ранние стадии заболевания, позволит упростить и повысить эффективность диагностики, что может сократить экономические потери в хозяйствах от данного заболевания.

Вывод

В результате проведенных исследований получены следующие результаты:

1. Подобраны видоспецифичные праймеры на область гена β -тубулина, обеспечивающие детекцию патогена методом ПЦР.

2. Оптимизированы условия реакции ПЦР. На основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров, были составлены следующие температурно-временной режим и состав реакционной смеси для проведения ПЦР: 94°C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 45 с, 72 °C – 1 мин 30 с (35 циклов), 72 °C – 7 мин (1 цикл); состав реакционной смеси: 10x буфер-10 мкл; 0,2 mM дНТФ; 2 mM Mg²⁺; 400 nM каждого праймера; фермент – 2 ед.

3. Разработанная ПЦР тест-система является высокоспецифичной и позволяет выявлять нуклеиновую кислоту возбудителя желтой пятнистости пшеницы в количестве 2,6 пг. Данное значение является относительно высоким и свидетельствует о корректной оптимизации ПЦР и эффективности предложенной диагностической системы.

Исследования выполнены при поддержке Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках ПЦФ «Разработка инновационных систем для повышения устойчивости сортов пшеницы к особо опасным болезням в Республике Казахстан» на 2018-2020 гг. (№ BR06249329).

Литература

- 1 Lamari L., Bernier C.C. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the different host reaction // *Can. J. Plant Pathol.* – 1989. – Vol. 11. – P. 284-290.
- 2 Gurung, S., Short, D.P.G., Adhikari, T.B. Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // *Fungal Genetics and Biology.* – 2013. Vol. 52. – P. 32-41.
- 3 Manning, V.A., Pandelova, I., Dhillon, B., Wilhelm, L.J., Goodwin, S.B., Berlin, A.M., Figueroa, M., Freitag, M., Hane, J.K., Henrissat, B., Holman, W.H., Kodira, C.D., Martin, J., Oliver, R.P., Robbertse, B., Schackwitz, W., Schwartz, D.C., Spatafora, J.W., Turgeon, B.G., Yandava, C., Young, S., Zhou, S., Zeng, Q., Grigoriev, I.V., Ma, L.J., Ciuffetti, L.M. Comparative genomics of a plant-pathogenic fungus, *Pyrenophora tritici-repentis*, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence. // *G3: Genes, Genomes, Genetics.* – 2013. Vol. 3. – P. 41-63.
- 4 Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. // *Aust J Agric Res.* – 1988. Vol. 39. – P. 141-151.
- 5 Hosford R.M. Tan spot of wheat and related disease workshop. /R.M. Hosford (ed.). North Dakota State University, Fargo, 1982.
- 6 Weiss M.V. Compendium of Wheat Diseases, ed 2. St. Paul, APS Press, 1987.
- 7 Oerke E.C. Crop losses to pests. // *J Agric Sci.* – 2016. Vol. 144. – P. 31-43.
- 8 Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. // *Nature Genetics.* 2006. – Vol.38. – P.953–956.
- 9 Antoni E.A., Rybak K., Tucker M.P., Hane J.K., Solomon P.S., Drenth A., Shankar M., Oliver R.P. Ubiquity of ToxA and absence of ToxB in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis* // *Australasian Plant Pathology.* 2010. – Vol.39. – P.63–68.

- 10 Mikhailova L.A., Ternuk I.G., Mironenko N.V. Structure of *Pyrenophora tritici-repentis* populations from European part of Russia by virulence. // *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2007. – Vol.41. – P. 269–275.
- 11 Койшыбаев М. Распространение и развитие желтой пятнистости пшеницы в Казахстане // *Микология и фитопатология*. – 2010. – Т. 45. – Вып. 2. – С. 177-186.
- 12 Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 99 (1). – P. 161-167.
- 13 Hudcovicova M., Matusinsky P., Gubis J., Leisova-Svobodova L., Heinonen U., Ondreickova K., Mihalik D., Gubisova M., Majeska M., Jalli M. DNA markers for identification of *Pyrenophora tritici-repentis* and detection of genetic diversity among its isolates. *Romanian agricultural research*. 2015. – Vol.32. – P.1-10.
- 14 Abdullah A.S., Turo C., Moffat C.S., Lopez-Ruiz F.J., Gibberd M.R., Hamblin J., Zerihun A. Real-Time PCR for Diagnosing and Quantifying Co-infection by Two Globally Distributed Fungal Pathogens of Wheat // *Front. Plant Sci*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1086-1089
- 15 Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы // *Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов*. – Санкт-Петербург, 2012. – 56 с.
- 16 Lamari, L., Bernier, C.C. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. // *Phytopathology*. – 1991. – Vol. 81. – P. 1092-1095.
- 17 White T.J., Bruns T., Lee S. *Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. // New York, Academic Press Inc. – 1990. – P. 315-322.
- 18 Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kausserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. // *BMC Microbiol*. – 2010. – P. 189-198.
- 19 Kulik T., Fordoński G., Pszczółkowska A., Płodzień K., Łapiński M. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* // *FEMS Microbiol Lett*. – 2004. – P. 181-186.
- 20 Edwards S.G., O'Callaghan J., Dobson A.D.W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. // *Mycol Res*. – 2002. – Vol. 106. – P. 1005-1025.
- 21 Wang X., Zhao J., Han Q., Huang L., Kang Z. The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves. // *Eur J Plant Pathol*. – 2008. Vol. 120. – P. 241-247.
- 22 Zhao J., Wang X.J., Chen C.Q., Huang L.L., Kang Z.S. A PCR-based assay for detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat. // *Plant Dis*. – 2007. Vol. 91. – P. 1669-1674.
- 23 Ma Z, Yoshimura M, Holtz B, Michailides TJ: Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. // *Pest Manag Sci*. – 2005. – Vol. 61. – P. 449-457.
- 24 Schena L., Nicosia M.G., Li D., Sanzani S.M., Faedda R., Ippolito A., et al. Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. // *J Plant Pathol*. – 2013. – P. 7-24.
- 25 Sanoubar R., Bauer A., Seigner L. Detection, identification and quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in wheat kernels by PCR techniques. // *J Plant Pathol Microbiol*. – 2015. – P. 286-287.

References

- 1 Abdullah A.S., Turo C., Moffat C.S., Lopez-Ruiz F.J., Gibberd M.R., Hamblin J., Zerihun A. (2018) Real-Time PCR for Diagnosing and Quantifying Co-infection by Two Globally Distributed Fungal Pathogens of Wheat . *Front. Plant Sci*. – Vol.9, p. 1086-1089.
- 2 Antoni E.A., Rybak K., Tucker M.P., Hane J.K., Solomon P.S., Drenth A., Shankar M., Oliver R.P. (2010) Ubiquity of ToxA and absence of ToxB in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis* . *Australasian Plant Pathology*. Vol.39, P.63–68..
- 3 Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kausserud H. (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. . *BMC Microbiol.*, p. 189-198.
- 4 Edwards S.G., O'Callaghan J., Dobson A.D.W. (2002) PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. . *Mycol Res.*, Vol. 106, p. 1005-1025.
- 5 Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. . *Nature Genetics*. Vol. 38, P. 953–956.
- 6 Gurung, S., Short, D.P.G., Adhikari, T.B. (2013). Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. . *Fungal Genetics and Biology*. 52: 32-41.
- 7 Hosford R.M. *Tan spot of wheat and related disease workshop*. /R.M. Hosford (ed.). North Dakota State University, Fargo, 1982.
- 8 Hudcovicova M., Matusinsky P., Gubis J., Leisova-Svobodova L., Heinonen U., Ondreickova K., Mihalik D., Gubisova M., Majeska M., Jalli M. (2015) DNA markers for identification of *Pyrenophora tritici-repentis* and detection of genetic diversity among its isolates.. *Romanian agricultural research*. Vol.32, P.1-10.
- 9 Kojshybaev M. (2010) Rasprostranenie i razvitie zheltj pjatnistosti pshenicy v Kazahstane [The distribution and development of yellow spot of wheat in Kazakhstan] . *Mikologija i fitopatologija*. Vol.45, p. 177-186 [in Russian].
- 10 Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. (2017) Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot . *Journal of Plant Pathology*. Vol. 99 (1), P. 161-167.

- 11 Kulik T., Fordoński G., Pszczółkowska A., Płodzień K., Łapiński M. (2004) Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. *FEMS Microbiol Lett.*, p. 181-186.
- 12 Lamari L., Bernier C.C. (1989) Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the different host reaction. *Can. J. Plant Pathol.* P. 284-290.
- 13 Lamari, L., Bernier, C.C. (1991). Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology*. Vol. 81, p. 1092-1095.
- 14 Ma Z, Yoshimura M, Holtz B, Michailides T.J. (2005) Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Manag Sci*, Vol. 61, p. 449-457.
- 15 Manning, V.A., Pandelova, I., Dhillon, B., Wilhelm, L.J., Goodwin, S.B., Berlin, A.M., Figueroa, M., Freitag, M., Hane, J.K., Henrissat, B., Holman, W.H., Kodira, C.D., Martin, J., Oliver, R.P., Robbertse, B., Schackwitz, W., Schwartz, D.C., Spatafora, J.W., Turgeon, B.G., Yandava, C., Young, S., Zhou, S., Zeng, Q., Grigoriev, I.V., Ma, L.J., Ciuffetti, L.M. (2013). Comparative genomics of a plant-pathogenic fungus, *Pyrenophora tritici-repentis*, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence. *G3: Genes. Genomes. Genetics.* 3: 41-63.
- 16 Mihajlova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. (2012) Zheltaja pjatnistost' pshenicy [Tan spot of wheat]. Metodicheskie ukazaniya po izucheniju populjacij vozbuditelja zheltoj pjatnistosti *Pyrenophora tritici-repentis* i ustojchivosti sortov. – Sankt-Peterburg, 56 s [in Russian].
- 17 Mikhailova L.A., Ternuk I.G., Mironenko N.V. (2007) Structure of *Pyrenophora tritici-repentis* populations from European part of Russia by virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya*. Vol.41, P. 269–275.
- 18 Oerke E.C. (2016) Crop losses to pests. *J Agric Sci.* vol. 144, p. 31-43.
- 19 Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. (1988) Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Aust J Agric Res.* Vol. 39, p. 141-151.
- 20 Sanoubar R., Bauer A., Seigner L. (2015) Detection, identification and quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in wheat kernels by PCR techniques. *J Plant Pathol Microbiol.*, p. 286-287.
- 21 Schena L., Nicosia M.G., Li D., Sanzani S.M., Faedda R., Ippolito A., et al. (2013) Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. *J Plant Pathol.*, p. 7-24.
- 22 Wang X., Zhao J., Han Q., Huang L., Kang Z. (2008) The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves. *Eur J Plant Pathol* Vol. 120, p. 241-247.
- 23 Weiss MV: Compendium of Wheat Diseases, ed 2. St. Paul, APS Press, 1987.
- 24 White T.J., Bruns T., Lee S. Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *New York, Academic Press Inc*, pp 315-322.
- 25 Zhao J., Wang X.J., Chen C.Q., Huang L.L., Kang Z.S. (2007) A PCR-based assay for detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat. *Plant Dis.*, Vol. 91, p. 1669-1674.