

ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ ГРИБОВ РОДА *SCLEROTINIA*С.А. БЛИНОВА^{1,2}, М.Л. КОНЫШЕВА², А.А. ШВАРЦЕВ^{2,3},
А.А. СОЛОВЬЕВ¹, Я.И. АЛЕКСЕЕВ², Е.С. МАЗУРИН⁴

(¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии)
² ООО «НПФ Синтол»
³ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
⁴ ООО «Сингента»)

Грибы являются возбудителями множества болезней растений, наносящих значительный ущерб урожаю и приводящих к существенным экономическим потерям. Одними из самых широко распространенных и опасных патогенов являются грибы рода *Sclerotinia*. Представители данного рода способны поражать большинство важных сельскохозяйственных культур ввиду отсутствия у последних устойчивости, что впоследствии приводит к гибели растений. В связи с этим необходимо проводить диагностику растительного материала на наличие грибов данного рода. Целью исследований являлась апробация разработанных систем праймеров и зондов для выявления наиболее опасных представителей рода *Sclerotinia* – таких, как *S. sclerotiorum*, *S. nivalis*, *S. borealis* и *S. minor*. Проверка проводилась как на заведомо положительных образцах культур грибов, так и на растениях с полей (в частности, озимой пшеницы – для проведения скринингового исследования и определения уровня зараженности *S. borealis*). Материалом для исследований послужили 24 образца грибов, относящихся к роду *Sclerotinia*, полученные из ООО «Сингента», и 37 образцов озимой пшеницы из разных мест возделывания. Определение видовой принадлежности культур грибов осуществлялось методом секвенирования по Сенгеру с использованием разработанных пар праймеров на участок гена β -tubulin (*tub*) и фрагмент кластера генов *rRNA*. Дополнительно были сконструированы олигонуклеотиды для проведения видовой дифференциации вида *S. borealis* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При определении аналитических характеристик набора было показано отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Проведение скрининговых исследований 37 образцов озимой пшеницы показало наличие нуклеиновых кислот исследуемого патогена у 24,3% проанализированных образцов. При проведении исследования не было обнаружено сильно зараженных образцов, что говорит о нахождении патогена в начальной фазе его развития.

Ключевые слова: *Sclerotinia*, грибы, ПЦР, набор реагентов, озимая пшеница, зараженность, диагностика.

Введение

Грибы рода *Sclerotinia* являются одними из самых опасных патогенов растений. Повсеместное распространение, широкий круг растений-хозяев, отсутствие высокого уровня резистентности к исследуемым видам грибов, трудность в борьбе

с болезнями, вызванными *Sclerotinia*, и существенный ущерб посевам способствуют необходимости детального изучения данного патогена [17].

Грибы рода *Sclerotinia* поражают большое количество видов растений включая полевые и плодовые культуры, декоративные растения, деревья, кустарники и сорные растения. Ежегодные потери урожая от болезней, вызванных данной группой фитопатогенов, оцениваются в несколько сотен миллионов долларов. Потери урожая восприимчивых культур варьируются и могут достигать 100% [19]. Несмотря на то, что грибы данного рода чаще всего встречаются в регионах с прохладным влажным климатом, поступают сообщения о вспышках заболеваний, вызванных этими грибами, в засушливых регионах. Даже при наличии неблагоприятного для патогена климата заражение может происходить в летние месяцы на орошаемых полях.

Основным источником инфекции являются аскоспоры. Грибы рода *Sclerotinia* sp., хотя и способны продуцировать микроконидии, их роль в первичном распространении патогена и его жизненном цикле изучена недостаточно. Вторичное распространение происходит путем роста мицелия между основаниями стеблей или при контакте надземных частей зараженных растений со здоровыми в конце вегетационного периода [20].

Склеротиниоз, или белая гниль, – грибное заболевание, вызываемое представителями рода *Sclerotinia*, в котором наибольший интерес в качестве объекта изучения представляют два близкородственных вида: *S. sclerotiorum* ((Libert) de Bary, 1884) и *S. minor* (Jagger, 1920).

Типичные видимые симптомы болезни – наличие водянистой мягкой гнили стеблей и листьев. *S. sclerotiorum* – опасный и разрушительный фитопатоген, с широким кругом растений хозяев из различных семейств: *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae* и *Leguminosae* [2, 22]. *S. minor* поражает аналогичные культуры, но имеет более узкий диапазон восприимчивых растений и представляет наибольшую опасность для таких сельскохозяйственных культур? как салат, подсолнечник, шпинат, томаты, перец и арахис [2, 15].

Грибы рода *Sclerotinia* – некротрофные грибные патогены, способные поражать растения на любом этапе вегетационного периода. Помимо этого, они могут заражать плоды в хранилищах, что приводит к заметному снижению их качества. Кроме того, большую часть жизни представители *Sclerotinia* sp. могут проводить в виде склероций – твердых меланизированных структур, позволяющих им сохраняться в почве или растительных остатках в течение длительного времени (около 5 лет) [18]. Эти структуры являются частью механизма выживания в неблагоприятных внешних условиях или в случае отсутствия растения-хозяина и способствуют дальнейшему заражению всех последующих культур [3, 27].

Склероции *S. sclerotiorum* обычно имеют диаметр 2–5 мм, в то время как у *S. minor* образуются небольшие склероции диаметром 0,5–2 мм. В условиях повышенной влажности и температурного режима в пределах 4–18°C склероции в пределах верхнего слоя почвенного профиля прорастают, формируя апотеции. Апотеции представляют собой чашеобразные желтовато-коричневые структуры диаметром 3–5 мм, способные производить большое количество половых спор – аскоспор [1, 18, 26]. Аскоспоры способны колонизировать надземные части растений, используя их в качестве источника питательных веществ, вызывая при этом стеблевую гниль, пятнистость цветков, гниль плодов и т.д. [10, 11].

Первыми признаками заражения *S. sclerotiorum* является появление темных пятен или водянистых поражений, которые со временем могут неравномерно распространяться и даже опоясывать стебли, что приводит к увяданию и гибели растений. Инфицированные ткани имеют мягкую водянистую структуру и могут густо покрываться белым мицелием как внутри, так и снаружи. По мере прогрессирования болезни ткани растения иссушаются и выглядят обесцвеченными [11, 18]. Возникновение

корневых и прикорневых инфекций, вызванных грибами рода *Sclerotinia*, связано с прорастанием склероциев, находящихся в почве [5].

S. borealis (Bubák и Vleugel, 1917) является не менее разрушительным патогеном, поражающим более 17 родов растений из семейств *Alliaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Campanulaceae*, *Fabaceae*, *Iridaceae*, *Pinaceae* и *Poaceae*. В отличие от упомянутых ранее видов, являющихся космополитами, этот фитопатогенный гриб является психрофилом, в его ареал входят Япония, Россия, страны Северной Америки, Скандинавии, ограничен Северным полярным кругом. *S. borealis* поражает растения в состоянии покоя под снежным покровом, вызывая «снежную плесень», при этом оптимальная температура роста составляет 4–10°C [8, 14].

По сравнению с другими видами *S. nivalis* (Saito, 1997) является наименее изученным патогеном. Основное отличие от близкородственных видов – охват более узкого круга растений-хозяев: *Arctium lappa*, *Chrysanthemum morifolium*, *Ambrosia elatior*, *Angelica acutiloba*, *Ajuga reptans*, *Plantago lanceolata*, *Aralia elata*, *Atractylodes japonica*, *Daucus carota*, *Lactuca sativa*, *Panax ginseng*, *Pulsatilla koreana*, *Sedum sarmentosum* [13, 24].

Заболевания, вызванные представителями рода *Sclerotinia*, трудно поддаются контролю и прогнозированию. У большинства поражаемых сельскохозяйственных культур устойчивость к грибам рода *Sclerotinia* отсутствует. Вспышки инфекций, вызванных аскоспорами, носят, как правило, случайный характер и зависят от внешних условий [4]. Для эффективной защиты большинства сельскохозяйственных культур от патогенных грибов рода *Sclerotinia* применяется комплекс мер: использование здорового посадочного материала, агротехнических методов, обработки фунгицидами [6]. Стоит отметить, что такой подход эффективен только для культур с детально изученным циклом развития инфекции, на основе которого разрабатываются системы мониторинга и прогнозирования [20, 21].

Идентификация представителей рода *Sclerotinia* на основе морфологических признаков (характерных особенностей, размера склероциев, асков и аскоспор, растений-хозяев, симптомов заражения) не всегда является точной, особенно при идентификации близкородственных видов [25]. Для своевременного обнаружения грибов рода *Sclerotinia* необходимы высокоспецифичные и чувствительные системы диагностики.

Несмотря на широкое распространение и опасность грибов рода *Sclerotinia*, на сегодняшний день отмечается недостаточность исследований, посвященных молекулярной диагностике. Одно из крупных исследований было опубликовано в 2011 г. и посвящено секвенированию полного генома *S. sclerotiorum* [25]. По остальным видам основная часть работ нацелена на сравнение нуклеотидных последовательностей генов, полученных от изолятов из разных стран. Авторы данных работ делают упор на изучение однонуклеотидных полиморфизмов с последующим влиянием их на аминокислотные последовательности белков [7]. Большинство нуклеотидных последовательностей грибов рода *Sclerotinia* в базе данных NCBI GenBank принадлежит изолятам, обнаруженным в странах Азии. Изучение вышеописанного рода грибов в Европейской части материка позволит определить однонуклеотидные замены и проследить пути распространения данного патогена.

Цель исследований: разработка праймерных систем и скрининг образцов озимой пшеницы для своевременной диагностики грибов рода *Sclerotinia* и предотвращения их распространения по территории Российской Федерации.

Материал и методика исследований

Исследования проведены на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ. В работе использовали образцы ДНК *S. sclerotiorum*, *S. nivalis*, *S. borealis* и *S. Minor*, полученные от ООО «Сингента».

Тестирование разработанных наборов реагентов было проведено на растениях, отобранных с полей и имеющих естественно высокий инфекционный фон по визуальным наблюдениям предыдущих трех лет.

Образцы озимой пшеницы для диагностики *Sclerotinia borealis* были отобраны из следующих регионов: Алтайский край – 1 образец; Республика Татарстан – 6 образцов; Республика Башкортостан – 14 образцов; Нижегородская область – 2 образца; Ульяновская область – 9 образцов; Пензенская область – 4 образца.

Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием набора реагентов ФитоСорб-П. Для выделения ДНК были отобраны некротизированные участки листьев (фрагменты на границе живой и мертвой ткани). Все фрагменты листьев, отобранные с одного растения, объединялись в одну пробу. Число отобранных проб для анализа составляло 25–50 шт. (25–50 растений) и расценивалось как один образец. Зараженность образца определяли, исходя из количества зараженных растений к общему числу растений, отобранных для анализа.

Для проведения классической ПЦР и ПЦР в режиме реального времени использовали 10X ПЦР-Буфер-Б (ООО «Синтол», Россия), *SynTaq* ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами (ООО «Синтол», Россия). Финальная концентрация компонентов реакционной смеси была следующей: 3 мМ $MgCl_2$; 0,25 мМ dNTP; 2,5 ед. активности *SynTaq* ДНК-полимеразы. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Синтез олигонуклеотидов и расходные материалы были предоставлены компанией ООО «Синтол».

Для повышения чувствительности и специфичности олигонуклеотидов учитывались следующие параметры: средняя температура отжига для прямого и обратного праймера составляла 60°C, для зонда – на 2–4°C выше; наличие на 3'-конце праймера G или C нуклеотида («GC-зажим»). В качестве флуоресцентного красителя использовали FAM, присоединенный к 5'-концу зонда, а в качестве гасителя флуоресценции – RTQ1, присоединенный к 3'-концу. Наличие/отсутствие вторичных структур (шпилек, димеров) проверяли с помощью онлайн-приложений Олиго Кальк: программа для расчета свойств олигонуклеотидов (праймеров) [12] и Multiple Primer Analyzer [9]. Для определения температуры отжига олигонуклеотидов использовали онлайн-приложение Promega Biomath Calculators (буфер 5X PCR Buffer с концентрацией $MgCl_2$, 3 мМ) [23]. В реакционной смеси использовали концентрацию праймеров 800 нМ и концентрацию зондов 400 нМ.

Программа амплификации для классической ПЦР состояла из следующих этапов: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 сек.; 60°C – 10 сек.; 72°C – 40 сек. (35 циклов); 72°C – 5 мин. Определение молекулярной массы продуктов амплификации проводили с помощью горизонтального агарозного гель-электрофореза с визуализацией в ультрафиолетовом излучении (UV). Электрофорез проводили при следующих параметрах: 1,5% – агарозный гель, напряжение – 100V, время – 40 мин. Размер амплифицируемого фрагмента определяли относительно маркера молекулярного веса M-100 (ООО «Синтол», Россия) с диапазоном от 100 до 1000 пар оснований. Программа амплификации для ПЦР в режиме реального времени состояла из следующих этапов: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 сек.; 60°C – 40 сек. (считывание сигнала флуоресценции), 50 циклов.

Очистку продуктов амплификации проводили набором ColGen (ООО «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя.

Секвенирование последовательностей проводили на приборе Нанофор 05 («Институт аналитического приборостроения РАН», Россия). Анализ и обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения UGENE («УНИПРО», Россия) и AliView (Уппсальский университет, Швеция). Для создания множественного выравнивания использовали программу MAFFT v.7.503. Поиск последовательностей ДНК-мишеней осуществляли в базе данных NCBI GenBank [16].

Результаты и их обсуждение

Подтверждение принадлежности образцов к изучаемым видам проводили с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Для этого, с опорой на последовательности из базы данных NCBI GenBank, была разработана пара праймеров: Scler_Seq_F (5'-TGCTGCTTCTGGTACGAAATC-3') и Scler_Seq_R (5'-ATACTTGTTC-CGGAAGCCTTG-3'), позволяющая проводить видовую идентификацию *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *S. nivalis* по гену, кодирующему β -tubulin (tub). Ввиду отсутствия последовательностей данного гена в базе данных для вида *S. borealis* нами была сконструирована отдельная пара праймеров на фрагмент кластера генов rRNA: Scler.bor_Seq_F (5'-AATGCGATAAGTAATGTGAATTG-3') и Scler.bor_Seq_R (5'-TTA-AGTTCAGCGGGTATCC-3'). Ожидаемая длина продуктов амплификации составила 308 п.о. и 311 п.о. соответственно.

Было исследовано 24 образца, предположительно относящихся к роду *Sclerotinia*. Все образцы проанализированы с использованием праймеров Scler_Seq и Scler.bor_Seq в двукратной повторности.

Для проведения видовой идентификации использовали консервативные участки гена β -tubulin (tub) и фрагмент кластера rRNA, характерные для каждого вида. Основываясь на данных литературы, пришли к заключению о том, что гены tub и 18S rRNA обладают высокой вариабельностью. Это является важным для выявления генетического полиморфизма – как межвидового, так и внутривидового, поэтому их часто используют для уточнения таксономического положения представителей царства Грибы [28]. Положения селективных нуклеотидов и референсные последовательности NCBI GenBank указаны в таблице 1. В результате анализа данных секвенирования участков двух генов была установлена принадлежность: четырех образцов – к виду *S. Sclerotiorum*; двух образцов – к виду *S. Nivalis*; двух образцов – к виду *S. Minor*; 16 образцов – к виду *S. borealis*.

Таблица 1

Положение селективных нуклеотидов и референсные последовательности

Номер референсной последовательности	Изучаемый вид	Таргетный ген	Нуклеотид/положение							
			T/111	C/126	A/157	C/185	T/207			
MK089776.1	<i>S. sclerotiorum</i>	β -tubulin (tub)	T/111	C/126	A/157	C/185	T/207			
KT023311.1	<i>S. nivalis</i>	β -tubulin (tub)	A/88	A/152	G/168	T/245	A/261	T/266	T/269	A/297
KY701261.1	<i>S. minor</i>	β -tubulin (tub)	C/219	C/249	C/316	G/318	G/319	A/337	G/369	A/411
MK934592.1		rRNA	A/447	A/452	C/455					
AF067644.1	<i>S. borealis</i>	rRNA	C/371	C/373	T/438	A/447	C/449			

При анализе образцов *S. borealis* с использованием праймеров Scler_Seq впервые были получены нуклеотидные последовательности гена β -tubulin (tub) для этого вида (рис. 1).

При множественном выравнивании участка гена β -tubulin (tub) выявлены отличия в нуклеотидных последовательностях *S. borealis*. В дальнейшем данный фрагмент гена tub можно использовать для видовой диагностики и идентификации всех видов склеротиний, изучаемых в данной работе.

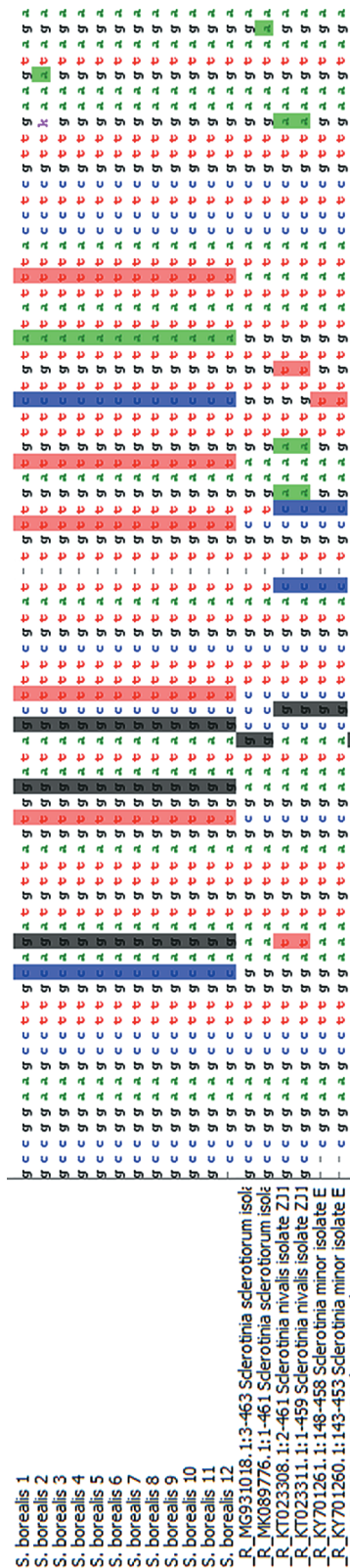


Рис. 1. Результаты множественного выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей *S. borealis* в сравнении с последовательностями *S. sclerotiorum*, *S. nivalis* и *S. minor* из базы данных NCBI

Опираясь на полученные данные, разработали олигонуклеотиды для ПЦР в режиме реального времени, на фрагмент кластера rRNA для идентификации *S. borealis*.

Аналитическую чувствительность тестируемых олигонуклеотидов определяли путем проведения серии последовательных 10-кратных разведений ДНК образца *S. borealis* с исходной концентрацией 21,7 нг/мкл. Для более достоверного результата каждую реакцию проводили в двух повторениях. Стабильный и специфичный сигнал наблюдался при разведении образца до $2,17 \times 10^{-3}$ нг/мкл, что соответствует 51 копии ДНК патогена. При разведении до $2,17 \times 10^{-4}$ нг/мкл (5 копий ДНК патогена) реакция была нестабильной, а при разведении до $2,17 \times 10^{-5}$ нг/мкл специфичная реакция полностью отсутствовала.

С использованием разработанных праймеров нами были исследованы 37 образцов озимой пшеницы из разных мест возделывания на наличие ДНК *S. borealis* методом ПЦР-РВ. Выделения нуклеиновых кислот образцов для анализа были проведены в 24- или 48-кратной повторности. Результаты анализа представлены в таблице 2. Большое количество повторов при исследовании образцов озимой пшеницы необходимо для выявления *S. borealis* в латентной фазе, чтобы предотвратить возможное дальнейшее распространение патогена, а также для определения уровня зараженности исследуемой территории.

Из 37 образцов, проанализированных в данной работе, только у 9 были обнаружены нуклеиновые кислоты *S. borealis*. Диапазон полученных пороговых циклов указывает на отсутствие сильно зараженных образцов. Такой результат характерен для единичных копий патогена. Эти результаты указывают на наличие изучаемого патогена в образцах в начальной стадии его развития: именно осенью происходит первичное инфицирование листьев патогена. Поскольку *S. borealis* может находиться в латентной фазе, необходимо будет проводить повторный отбор и диагностику в период активного роста патогена. Также для достоверных результатов мониторинга необходимо проводить отбор в разные сезонно-временные периоды.

В 2013 г. была опубликована статья по изучению *S. sclerotiorum* с использованием

метода секвенирования по Сэнгеру. В публикации изучались и сравнивались образцы из США и Китая по разным генам, в том числе по β -tubulin. Авторами были выявлены нуклеотидные замены, позволяющие отличать изоляты США от изолятов Китая. В наших исследованиях использовался участок, граничащий с участком, изучаемым в статье. В дальнейшем актуальным станет расширение изучаемого фрагмента гена для исследования распространения данного патогена [7].

Таблица 2

Результаты анализа 37 образцов озимой пшеницы на наличие ДНК *S. borealis* по каналу флуоресценции FAM

Образец	Зараженность, %	Пороговый цикл, ct	Образец	Зараженность, %	Пороговый цикл, ct
1	8,3	37–38	21	0	N/A
2	0	N/A	22	0	N/A
3	20,8	36–39	23	0	N/A
4	0	N/A	24	8,3	32–35
5	0	N/A	25	0	N/A
6	4,17	37–38	26	0	N/A
7	0	N/A	27	0	N/A
8	0	N/A	28	0	N/A
9	4,17	35,74	29	0	N/A
10	0	N/A	30	0	N/A
11	0	N/A	31	0	N/A
12	0	N/A	32	8,3	37–38
13	0	N/A	33	0	N/A
14	0	N/A	34	8,3	36–37
15	0	N/A	35	0	N/A
16	0	N/A	36	0	N/A
17	0	N/A	37	4,17	38
18	0	N/A			
19	0	N/A			
20	4,17	33			

Примечание. N/A – не выявлено; Ct – значение порогового цикла ПЦР-РВ, отражающее количество копий ПЦР-мишени в исходном образце.

Выводы

Нами была подтверждена принадлежность 24 образцов грибов к роду *Sclerotinia*. С помощью разработанных праймеров *Scler_Seq* и *Scler.bor_Seq* были получены нуклеотидные последовательности фрагментов генов β -tubulin (*tub*) и фрагмент кластера rRNA, последующее выравнивание которых позволило определить селективные нуклеотиды и провести видовую идентификацию изучаемых грибов. Впервые были получены последовательности гена β -tubulin для *S. borealis*. Новые данные позволяют разработать высокоспецифичную и чувствительную систему видовой диагностики.

На основе полученных данных были разработаны олигонуклеотиды для идентификации *S. borealis* на фрагмент кластера rRNA методом ПЦР в режиме реального времени. Проведя анализ 37 образцов озимой пшеницы, обнаружили единичные копии исследуемого патогена, что может свидетельствовать о нахождении возбудителя в латентной фазе. Для достоверного результата необходимо повторить исследование, используя большее количество образцов озимой пшеницы, отобранных в разные вегетационные периоды.

Дальнейшая разработка олигонуклеотидов для видовой диагностики методом ПЦР-РВ позволит проводить скрининговые исследования злаковых культур. Результаты проведенной работы могут помочь исследовательским центрам и институтам в своевременном проведении диагностических исследований для предотвращения потерь урожая злаковых культур и распространения склеротиний по территории РФ.

Библиографический список

1. *Abawi G.S., Grogan R.G.* Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 1979; 69:899–903.
2. *Abd-Elmagid A., Garrido P., Hunger R. et al.* Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia* // *Journal of Microbiological Methods*. 2013; 92 (3):293–300.
3. *Agrios G.N.* *Sclerotinia* diseases. *Plant pathology*. 2005; 5:546–550.
4. *Almqvist C., Wallenhammar A. – C.* Monitoring of plant and airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* in spring oilseed rape using real-time PCR. *Plant pathology*. 2014; 64 (1):109–118.
5. *Amsalem J., Cuomo C., Van Kan J. et al.* Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* // *PLOS Genetics*. 2011; 7 (8): e1002230.
6. *Andrade C., Tinoco M., Rieth A. et al.* Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* // *Plant pathology*. 2015; 65 (4):626–632.
7. *Attanayake R., Carter P., Jiang D. et al.* *Sclerotinia sclerotiorum* Populations Infecting Canola from China and the United States Are Genetically and Phenotypically Distinct. *Phytopathology*. 2013; 103 (7):750–761.
8. *Badet T., Peyraud R., Raffaele S.* Common protein sequence signatures associate with *Sclerotinia borealis* lifestyle and secretion in fungal pathogens of the Sclerotiniaceae. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6.
9. *Breslauer K., Frank R., Blöcker H., Marky L.* Predicting DNA duplex stability from the base sequence // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986; 83 (11):3746–3750.
10. *Grau C.R., Hartman G.L.* *Sclerotinia* stem rot. *Compendium of soybean diseases*, 1999; 4:46–48.
11. *Heffer L.V., Johnson K.B.* *White Mold. The Plant Health Instructor*, 2007.
12. *Kibbe W.A.* «OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator» // *Nucleic Acids Research*. 2007; 35 (webservice issue).

13. Li G., Wang D., Jiang D. et al. First report of *Sclerotinia nivalis* on lettuce in central China // *Mycological Research*. 2000; 104 (2):232–237.
14. Mardanov A., Beletsky A., Kadnikov V., Ignatov A., Ravin N. Draft Genome Sequence of *Sclerotinia borealis*, a Psychrophilic Plant Pathogenic Fungus. *Genome Announcement*. 2014; 2 (1).
15. Melzer M.S., Smith E.A., Boland G.J. Index of plant host of *Sclerotinia minor* // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1997; 19:272–280.
16. National Center for Biotechnology Information (NCBI) // Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/1988> (дата обращения: 06.03.2022).
17. O'Sullivan C., Belt K., Thatcher L. Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia* // *Frontiers in Plant Science*. 2021; 12:707509.
18. Peltier A., Bradley C., Chilvers M. et al. Biology, Yield loss and Control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean // *Journal of Integrated Pest Management*. 2012; 3 (2):1–7.
19. Purdy L. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact // *Phytopathology*. 1979; 69 (8):875.
20. Saharan G.S., Mehta N. Ultrastructures. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*, 2008: 163–199.
21. Saharan G.S., Mehta N. Disease Forecasting. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. 2008; 279–283.
22. Smolińska U., Kowalska B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – a review // *Journal of Plant Pathology*. 2018; 100 (1):1–12.
23. Universal Protein Resource (UniProt). URL: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения: 23.11.2021).
24. Wang C., Shang W. et al. White rot of *Panax quinquefolius* caused by *Sclerotinia nivalis* // *Plant pathology*. 2021; 70 (9):2034–2045.
25. Willetts H., Wong J. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature // *The Botanical Review*. 1980; 46 (2):101–165.
26. Wu B., Subbarao K., Qin Q. Nonlinear colony extension of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* // *Mycologia*. 2008; 100 (6):902–910.
27. Young C.S., Werner C.P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape // *Plant Pathology*. 2012; 61:730–738.
28. Zhao Z., Liu H., Luo Y. et al. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life // *Scientific Reports*. 2014; 4 (1).

OPTIMISATION OF MOLECULAR-GENETIC METHODS FOR DIAGNOSING FUNGI OF GENUS *SCLEROTINIA*

S.A. BLINOVA^{1,2}, M.L. KONY SHEVA², A.A. SHVARTSEV^{2,3},
A.A. SOLOV'EV¹, YA.I. ALEKSEEV², E.S. MAZURIN⁴

(¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology,

²LLC “Syntol”,

³Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,

⁴LLC “Syngenta”)

Phytopathogenic fungi are the causative agent for disruptive crop plant diseases, besides causing significant losses in crop yield annually. Sclerotinia is one of the most common and dangerous pathogens. Species of the Sclerotinia genus cause widespread disease across a broad range

of economically important agricultural crops. Regular screening of *Sclerotinia* in plant material is necessary due to wide host-plants range and absence of resistance to this phytopathogen. The purpose of this study was to test the developed systems of primers and probes to identify the most dangerous species of *Sclerotinia* genus, such as *S. sclerotiorum*, *S. nivalis*, *S. borealis* and *S. minor*. This system has been tested on positive samples of fungal cultures. Screening study and determination of the infection level with *S. borealis* were carried out on winter wheat. The material for the study was 24 samples of fungi belonging to the genus *Sclerotinia* obtained from Syngenta LLC and 37 winter wheat samples from different places of growth. Species identification of fungal cultures was carried out by Sanger sequencing using the developed pairs of primers for the β -tubulin (*tub*) gene region and a fragment of the rRNA gene cluster. Additionally, oligonucleotides were designed for the identification of *S. borealis* by real-time polymerase chain reaction (qPCR). In determining the analytical characteristics of the kit, the absence of false positive and false negative results was demonstrated. Screening studies of 37 winter wheat samples showed the presence of nucleic acids of the studied pathogen in 24.3% among the analyzed samples. There were no severely infected samples among the tested, which indicates that the pathogen is in the initial stage of its development.

Key words: *Sclerotinia*, fungi, PCR, reagent kit, winter wheat, infection, diagnostics.

References

1. Abawi G.S., Grogan R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 1979; 69: 899–903.
2. Abd-Elmagid A., Garrido P., Hunger R., et al. Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. *Journal of Microbiological Methods*. 2013; 92(3): 293–300.
3. Agrios G.N. *Sclerotinia* diseases. *Plant pathology*. 2005; 5: 546–550.
4. Almquist C., Wallenhammar A. – C. Monitoring of plant and airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* in spring oilseed rape using real-time PCR. *Plant Pathology*. 2014; 64 (1): 109–118.
5. Amselem J., Cuomo C., Van Kan J. et al. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS Genetics*. 2011; 7 (8): e1002230.
6. Andrade C., Tinoco M., Rieth A. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*. 2015; 65 (4): 626–632.
7. Attanayake R., Carter P., Jiang D., et al. *Sclerotinia sclerotiorum* Populations Infecting Canola from China and the United States Are Genetically and Phenotypically Distinct. *Phytopathology*. 2013; 103 (7): 750–761.
8. Badet T., Peyraud R., Raffaele S. Common protein sequence signatures associate with *Sclerotinia borealis* lifestyle and secretion in fungal pathogens of the Sclerotiniaceae. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6.
9. Breslauer K., Frank R., Blöcker H., Marky L. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986; 83 (11): 3746–3750.
10. Grau C.R., Hartman G.L. *Sclerotinia* stem rot. *Compendium of soybean diseases*. 1999; 4: 46–48.
11. Heffer L. *White Mold*. The Plant Health Instructor. 2007.
12. Kibbe W.A. “OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator”. *Nucleic Acids Research*. 2007; 35 (webservice issue).
13. Li G., Wang D., Jiang D., et al. First report of *Sclerotinia nivalis* on lettuce in central China. *Mycological Research*. 2000; 104 (2):232–237.
14. Mardanov A., Beletsky A., Kadnikov V., Ignatov A., Ravin N. Draft Genome Sequence of *Sclerotinia borealis*, a Psychrophilic Plant Pathogenic Fungus. *Genome Announcement*. 2014; 2 (1).

15. Melzer M.S., Smith E.A., Boland G.J. Index of plant host of *Sclerotinia minor*. Canadian Journal of Plant Pathology. 1997; 19: 272–280.
16. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Electronic source]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 1988. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Access date: 06.03.2022).
17. O'Sullivan C., Belt K., Thatcher L. Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. Frontiers in Plant Science. 2021; 12: 707509.
18. Peltier A., Bradley C., Chilvers M., et al. Biology, Yield loss and Control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. Journal of Integrated Pest Management. 2012; 3 (2): 1–7.
19. Purdy L. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. Phytopathology. 1979; 69 (8): 875.
20. Saharan G.S., Mehta N. Ultrastructures. *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. 2008: 163–199.
21. Saharan G.S., Mehta N. Disease Forecasting. *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. 2008: 279–283.
22. Smolińska U., Kowalska B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – a review. Journal of Plant Pathology. 2018; 100 (1): 1–12.
23. Universal Protein Resource (UniProt). URL: <https://www.uniprot.org/> (Access date: 23.11.2021).
24. Wang C., Shang W., et al. White rot of *Panax quinquefolius* caused by *Sclerotinia nivalis*. Plant Pathology. 2021; 70 (9): 2034–2045.
25. Willetts H., Wong J. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. The Botanical Review. 1980; 46 (2): 101–165.
26. Wu B., Subbarao K., Qin Q. Nonlinear colony extension of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. Mycologia. 2008; 100 (6): 902–910.
27. Young C.S., Werner C.P. Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape. Plant Pathology. 2012; 61: 730–738.
28. Zhao Z., Liu H., Luo Y., et al. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. Scientific Reports. 2014; 4 (1).

Блинова София Алексеевна, младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», научный сотрудник, ООО «Синтол»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; e-mail: sofya.blinova@yandex.ru; тел.: (915) 125–87–13

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

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

Соловьев Александр Александрович, д-р биол. наук, профессор РАН, заведующий лабораторией маркерной и геномной селекции растений «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; e-mail: a.soloviev70@gmail.com; тел.: (926) 164–16–30

Алексеев Яков Игоревич, канд. биол. наук, директор по науке ООО «Синтол»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 42; e-mail: jalex2071@gmail.com; тел.: (916) 628–00–31

Мазурич Евгений Сергеевич, канд. биол. наук, руководитель лабораторий тех. поддержки ООО «Сингента»; 115114, Российская Федерация, г. Москва, Летниковская ул., 2; e-mail: zarauh@mail.ru; тел.: (495) 933–77–55

Sofiya A. Blinova, Junior Research Associate, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Research Associate of LLC “Syntol” (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (915) 125–87–13); E-mail: sofya.blinova@yandex.ru)

Mariya L. Konyshева, Research Associate of of LLC “Syntol” (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (920) 627–04–90); E-mail: mariakorolewa@inbox.ru)

Aleksey A. Shvartsev, Research Associate of LLC “Syntol”, post-graduate student, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (925) 161–15–63; E-mail: alexey.sva@yandex.ru)

Aleksandr A. Solov’ev, DSc (Bio), RAS Professor, Head of the Laboratory of Marker and Genomic Plant Selection, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (926) 164–16–30); E-mail: a.soloviev70@gmail.com)

Yakov I. Alekseev, PhD (Bio), Scientific Director, LLC “Syntol” (42 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (916) 628–00–31); E-mail: jalex2071@gmail.com)

Evgeniy S. Mazurin, PhD (Bio), Head of Technical Support Laboratories, LLC “Syngenta” (2 Letnikovskaya Str., Moscow, 115114, Russian Federation; phone: (495) 933–77–55); E-mail: zarauh@mail.ru)