



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра Геоэкологии, природопользования и экологической безопасности

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(бакалаврская работа)

На тему Изучение видов септориозов зерновых колосовых культур, встречающихся
на территории европейской части Российской Федерации в 2022 году

Исполнитель Сидорова Виолетта Денисовна, Э-Б19-1-8

Руководитель доктор биологических наук, доцент, профессор
кафедры геологии, природопользования и экологической
безопасности

Зеленева Юлия Витальевна

«К защите допускаю»

Заведующий кафедрой

кандидат географических наук, доцент

Дроздов Владимир Владимирович

« » июня 2023 г.

Санкт-Петербург

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Описание видов – возбудителей септориозов, их систематическая принадлежность и вредоносность	7
1.2 Жизненный цикл возбудителей септориозов. Гомоталлические и гетероталлические виды	12
2. УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	17
2.1. Особенности аграрного сектора регионов сбора инфекционного материала	17
2.2 Материалы и методы исследований	20
3. ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДАМИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	30
4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-ЭФФЕКТОРОВ <i>SnToxA</i> , <i>SnTox1</i> И <i>SnTox3</i> У ВИДОВ <i>PARASTAGONOSPORA NODORUM</i> И <i>PARASTAGONOSPORA AVENAE</i>	34
5. ВИРУЛЕНТНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ <i>PARASTAGONOSPORA NODORUM</i> АЛТАЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ	41
6. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТИПОВ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ ГЕНА <i>Tsn1/tsn1</i> МЕТОДОМ ПЦР	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
ВЫВОДЫ	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	53
ПРИЛОЖЕНИЯ	58

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – агропромышленный комплекс

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КГА – картофельно-глюкозный агар

РФ – Российская Федерация

ВВЕДЕНИЕ

Септориозы являются одними из наиболее распространенных болезней зерновых культур. Они поражают все надземные органы растений.

Возбудители септориозов известны во всех зернопроизводящих странах [Navatheetal.,2020; Pakholkovaetal., 2021; Бакулина и др.,2020]. При благоприятных условиях септориозы могут достигать эпифитотийного уровня с прямыми потерями урожая более 40 % [Пахолкова и др., 2016; Пахолкова, Сальникова, 2019].

Болезнь вызывают несколько видов. Систематический мониторинг популяционной структуры фитопатогенов – один из важных этапов разработки мероприятий по производству экологически безопасной продукции в условиях меняющегося климата [Зеленева и др., 2022].

Цель работы: изучить видовой состав возбудителей септориоза зерновых колосовых культур в различных регионах России. А также охарактеризовать структуру популяций грибов.

Для достижения цели выпускной квалификационной работы поставлены следующие задачи:

1. изучить видовое разнообразие возбудителей септориозов пшеницы, тритикале, ржи и овса;
2. охарактеризовать структуру популяций микромицетов по морфолого-культуральным свойствам и вирулентности;
3. изоляты рода *Parastagonospora* из тамбовской и алтайской популяций оценить на наличие/отсутствие у них генов *Tox1*, *Tox3* и *ToxA* с помощью связанных с ними молекулярных маркеров;
4. с использованием ДНК-маркеров идентифицировать генетические детерминанты устойчивости к *SnToxA* у озимых и яровых сортов пшеницы.

Материалом для исследования служили:

1. инфекционные образцы (листья, побеги, колосья, зерна), собранные в различных регионах РФ;
2. сорта яровой и озимой пшеницы.

Объект исследования – моноконициальные изоляты грибов разных видов – возбудителей септориозов.

В работе задействованы группы источников, представленные научной литературой, материалами периодической печати, официальными сайтами и иными интернет-ресурсами.

В основу исследования положены такие методы, как анализ и синтез научного опыта в области фитопатологии, мониторинг возбудителей септориозов, обобщение научного опыта и результатов собственного исследования.

Теоретическая значимость выпускной квалификационной работы заключается в том, что полученные сведения о внутривидовой структуре фитопатогенов могут быть использованы в селекционно-генетической защите сельскохозяйственных растений.

Практическая значимость исследования определена тем, что полученные коллекционные штаммы микроорганизмов будут предложены селекционерам и фитопатологам для создания искусственных инфекционных фондов в опытных питомниках.

Структуру работы определило ее содержание, включающее введение, основную часть, разделенную на главы и параграфы, заключение, список использованных источников, приложения.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Септориозы - широко распространенные и вредоносные заболевания зерновых культур. В последние 30 лет они заняли прочное место в списке экономически важных болезней. В связи с этим фитопатологи и селекционеры уделяют им такое же внимание, как пиренофорозу, пыльной и твердой головне, фузариозу и другим болезням. В соответствии с Федеральной целевой программой «Упреждение и ликвидация эпифитотий и нашествий вредителей и их последствий» на 1998-2000 г, септориозы внесены в перечень особо опасных вредных организмов, вызывающих чрезвычайные ситуации в растениеводстве [Захаренко и др., 2001]. Частота вспышек массового развития заболеваний составляет 5-7 случаев из каждых 10 лет [Санин, 2002]. Наиболее вредоносны септориозы на пшенице. Потери урожая при их умеренном развитии находятся на уровне 10-15%, а при эпифитотиях -30-40% [Санин, 2002]. В последние 10-15 лет, особенно в годы с повышенной влажностью воздуха и частым выпадением осадков, наблюдается повсеместное распространение и развитие септориозов на ячмене, однако их вредоносность на этой культуре недооценивают, так как симптомы поражения часто относят к другим заболеваниям.

Одной из причин повсеместного распространения септориозов является отсутствие сортов, устойчивых к заболеваниям. Важным звеном в селекционном процессе является создание искусственных инфекционных фонов, для обоснования состава которых требуется углубленное изучение видовой структуры и внутривидового разнообразия популяций патогена и особенностей их формирования в разных агроклиматических зонах.

1.1 Описание видов – возбудителей септориозов, их систематическая принадлежность и вредоносность

Септориозы – опасные заболевания зерновых культур. В настоящее время болезнь септориозных пятнистостей стала серьезной угрозой мировому производству продовольствия.

Наиболее вредоносное развитие болезней отмечается при поражении трех верхних листьев растений в период от начала колошения до цветения, приводящее в фазу молочно-восковой спелости к полному усыханию листьев. Развиваясь на листьях, септориоз приводит к уменьшению их ассимиляционной поверхности и, как следствие, к ухудшению физиологических процессов. При сильном поражении листьев масса зерна с одного колоса снижается до 30%. На стеблях и узлах данное заболевание нарушает функции сосудистых пучков и вызывает полегание растений, уменьшение длины и озерненности колоса. Пораженное зерно становится щуплым и морщинистым. Вследствие этого масса 1000 зерен снижается до 65%, недобор урожая может достигать 40% [Санин, 2002].

Российскими учеными и коллегами из зарубежья регулярно проводится работа по изучению видового состава септориозов пшеницы, особенностей распространенности, вредоносности, определения положения в фитоценозе. Систематическую принадлежность видов уточняли на официальном сайте Микобанка [<https://www.mycobank>].

Самый распространенный вид – возбудитель септориозной пятнистости злаков – *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvl. & Crous – вызывает септориоз листьев пшеницы, тритикале, ячменя, ржи (рисунок 1).



Рисунок 1. Септориоз - экономически значимая болезнь стратегически важных культур

Пятна продолговатые, соломенного цвета, пятнистые от многочисленных пикнид. Пикниды золотисто-коричневые, с устьищем, иногда приплюснутые, эллиптические, 60-200 мкм, большей частью 100-150 мкм, с тонкой оболочкой, состоящей из 2-5 слоев золотисто-коричневых продолговатых тонкостенных клеток, с 1-4 промежуточными слоями полиэдрических клеток и внутреннего бесцветного слоя. Конидиеносцы узкобутылчатые, 5-13 x 1,3-3 мкм. Кондии двух типов: макрконидии обратнобулавовидно-нитчатые, 35-98 x 1,4-2,8 мкм, бесцветные; микроконидии согнутые или даже крючковатые, без перегородок, 5-9 x 0,3-1 мкм.

Царство Fungi

Отдел Dikarya

Подотдел Ascomycota (Pezizomycotina)

Класс Dothideomycetes

Подкласс Dothideomycetidae

Порядок Mycosphaerellales

Семейство Mycosphaerellaceae

Род *Zymoseptoria*

Вид *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvl. & Crous

На территории России зафиксировано два вида рода *Parastagonospora*, включающие три формы, способные вызывать септориоз злаков: *Parastagonosporanodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous, *Parastagonospora avenae* (A. B. Frank) Quaedvl., Verkley & Crous f. sp. *triticea* (пшеничная форма), *Parastagonospora avenae* (A. B. Frank) Quaedvl., Verkley & Crous f. sp. *avenaria* (овсяная форма).

Царство Fungi

Отдел Ascomycota

Подотдел Pezizomycotina

Класс Dothideomycetes

Подкласс Pleosporomycetidae

Порядок Pleosporales

Семейство Phaeosphaeriaceae

Род *Parastagonospora*

Вид *Parastagonosporanodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous

Вид *Parastagonospora avenae* (A. B. Frank) Quaedvl., Verkley & Crous f. sp. *triticea* (пшеничная форма)

Вид *Parastagonospora avenae* (A. B. Frank) Quaedvl., Verkley & Crous f. sp. *avenaria* (овсяная форма)

Вид *P. nodorum* – поражает лист, побег, колосовые чешуи, зерновку, ости, распространен на всех колосовых зерновых. Пятна невнятные. На колосковых и цветочных чешуях почти всегда они распространяются от верхушки; грязно-серо-фиолетовые или красновато-коричневые, довольно невнятно отграниченные; позднее пятна начиная от верхушки бледнеют и становятся более или менее желтовато- или серовато-коричневыми.

Пикниды большей частью около 80-140-210 мкм в диаметре, обычно расположены вдоль жилок, прорываются из-под эпидермиса только слабо развитыми устьицами. Конидии узкоцилиндрические, на концах закругленные, прямые или слегка согнутые, зрелые – с 3 перегородками, бесцветные, в массе телесного цвета, 15-25 x 2-2,75 мкм.

Данный вид распространен повсеместно, но чаще преобладает в зонах возделывания яровой пшеницы в силу своих биологических особенностей, перезимовки и путей распространения инфекции [Пахолкова и др., 2019]. В связи с этим регионами его наибольшего доминирования в России являются Центральный, Приволжский (отдельные районы), Северо-Западный, Сибирский.

P. avenae– поражает лист, побег, колосовые чешуи, зерновку, ости. Кроме пшеницы поражает многие злаки, но на овсе, как отмечено выше, своя форма. Пятна на листьях мелкие, желтоватые, продолговатые. Пикниды на пятнах под устьицами, в продольных рядах, точковидные, 90-150 мкм, коричневые, шаровидные или эллиптические, с устьицами 20-10 мкм. Пикноспоры бесцветные, палочковидные, прямые или согнутые, 20-45 x 3-4 мкм, большей частью с 3 перегородками.

Отличить симптомы поражения грибом *P. avenae* от пятен, вызванных *P. nodorum*, в полевых условиях не всегда возможно [Зеленева и др., 2022]. Точно идентифицировать возбудителя болезни можно только на основании современных методов определения нуклеотидных последовательностей филогенетически информативных локусов ДНК.

Вид *Septoria triticipicola* Lobik распространен на сортах пшеницы в Краснодарском крае, а также отмечается на территории Казахстана. Вызывает листовую пятнистость. Пятна бледные, вытянутые по длине листа. Пикниды на верхней стороне листьев, 105-168 мкм, погруженные, выступают округлым устьищем коло 17 мкм шир. с бледно-коричневой оболочкой. Конидии с тупыми концами, от основания вершине

утончающиеся, слегка согнутые, с 3-5 перегородками, бесцветные или бледно-зеленоватые, 26,3-48 x 3,3-3,9 мкм.

*Царство*Fungi

*Отдел*Dikarya

*Подотдел*Ascomycota (Pezizomycotina)

*Класс*Dothideomycetes

*Подкласс*Dothideomycetidae

*Порядок*Mycosphaerellales

*Семейство*Mycosphaerellaceae

*Род*Septoria

*Вид*Septoria triticicola Lobik

Септориоз ржи вызывается грибом *Septoria secalis* Prill. & Delacr. Болезнь проявляется линейными желто-серыми, буроватыми и коричневыми пятнами, окаймленными бурой или красной полосой, либо без каймы на всех надземных органах. Инфекция распространена всесветно в местах с достаточным увлажнением [Пересыпкин, 1989]. Пятна невнятные. Конидии цилиндрические, с туповатыми концами, прямые или согнутые, с 3 перегородками, бесцветные, с многочисленными каплями масла, 25-50 x 2-3,5 мкм. Микроконидии палочковидны, 10 x 0,5 мкм. На пожелтевших листьях и влагиалищах ржи.

*Царство*Fungi

*Отдел*Dikarya

*Подотдел*Ascomycota (Pezizomycotina)

*Класс*Dothideomycetes

*Подкласс*Dothideomycetidae

*Порядок*Mycosphaerellales

*Семейство*Mycosphaerellaceae

*Род*Septoria

*Вид*Septoria secalis Prill. & Delacr.

Одним из наиболее эффективных способов защиты от заболеваний является создание устойчивых сортов. Однако в отношении септориозов это является большой проблемой из-за полигенного характера наследования устойчивости к данным заболеваниям [Санин, 2002]. Наиболее длительную защиту могли бы обеспечить сорта, характеризующиеся замедленным развитием болезни в полевых условиях, способные снизить возможность возникновения эпифитотий и увеличить продолжительность устойчивости сорта, т.е. сорта с частичной устойчивостью к болезни. Перспективным является также использование сортов, обладающих толерантностью, которая проявляется в способности растений сохранять урожай при сильном поражении болезнью.

Таким образом, защита зерновых культур осуществляется с помощью сочетания мер: агротехническими мероприятиями, выращиванием устойчивых сортов и химической защитой.

1.2. Жизненный цикл возбудителей септориозов. Гомоталличные и гетероталличные виды

После уборки урожая грибы – возбудители септориозов зимуют на остатках стерни. В соломе развивается половая стадия фитопатогенов. Гриб прорастает и его мицелий пронизывает сухую растительную ткань (рисунок 2) [Агроном. Септориоз листьев пшеницы. Эл. ресурс].

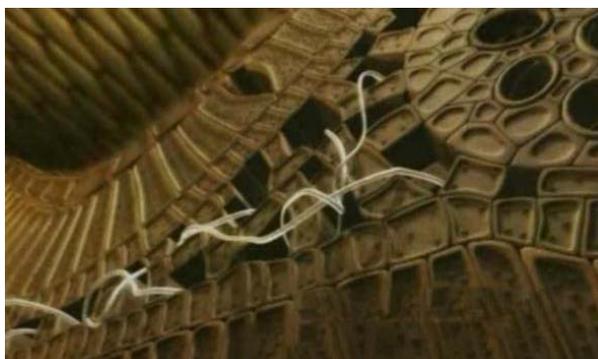


Рисунок 2. Прорастающий мицелий гриба на стерне

Следует учитывать, что виды *Z. tritici* и *P. nodorum* являются гетероталличными (у них происходит слияние мужского и женского мицелия). Таким образом, из разнополого мицелия образуется женская гамета – аскогон (*Ascogonium*). Она содержит много клеточных ядер. Из другого мицелия образуется мужская гамета – антеридий (*Antheridium*). Она так же наполнена клеточными ядрами. Аскогон образует специальную гифу – трихогину (*Trichogyne*). Она необходима для оплодотворения. Через трихогину мужские клеточные ядра переходят в аскогон и сближаются с женскими, но сразу не сливаются. Образуется диплоидный мицелий (рисунок 3). Вид *P. avenae* – гомоталличный. Его мицелий производит мужские и женские репродуктивные структуры, оба типа спаривающихся ядер образуют зиготу из одного и того же слоевища [Агроном. Септориоз листьев пшеницы. Эл. ресурс].

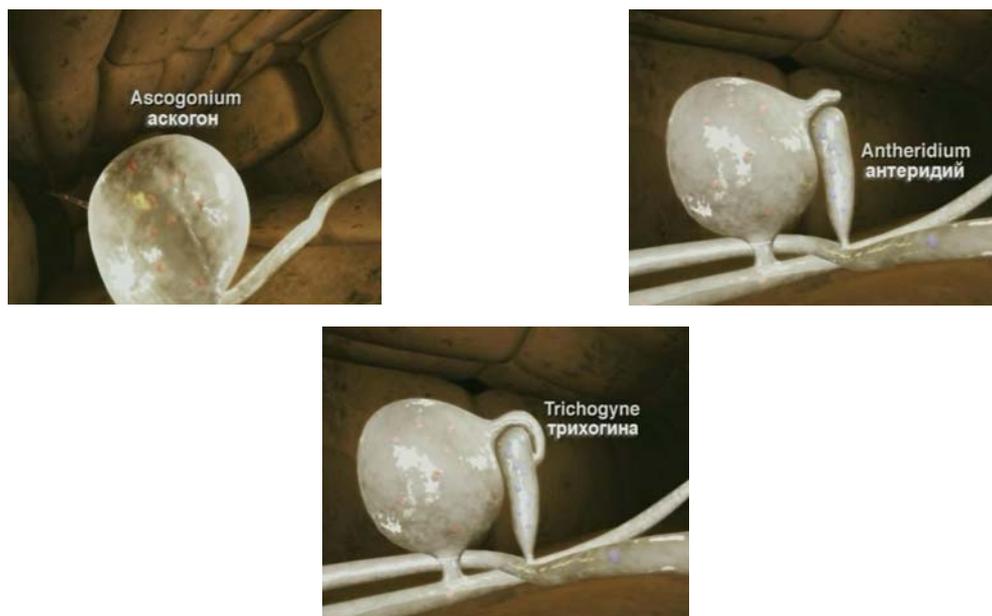


Рисунок 3. Слияние мужского и женского мицелия

Из аскогона формируются специальные выросты. В них синхронно делится каждая пара ядер. После чего происходит оплодотворение [Агроном. Септориоз листьев пшеницы. Эл. ресурс].

При последующем редукционном делении число хромосом уменьшается, образуются гаплоидные ядра. Происходит комбинативная изменчивость. Образуется восемь ядер. Они развиваются в сумчатых

материнских клетках до стадии половых аскоспор. Эти споры находятся в трубчатых клетках – асках, рядом друг с другом и окружены аскокарпом. Эти половые плодовые тела называются псевдотециями (рисунок 4) [Агроном. Септориоз листьев пшеницы. Эл. ресурс].



Диплоидный мицелий



Рисунок 4. Формирование аскоспор – полового поколения гриба

При повышении влажности воздуха аски набухают. Возросшее осмотическое давление приводит к тому, что аски лопаются и споры активно высвобождаются. С помощью ветра по воздуху, аскоспоры переносятся от одного растения к другому и от одного поля к другому (рисунок 5) [Агроном. Септориоз листьев пшеницы. Эл. ресурс].

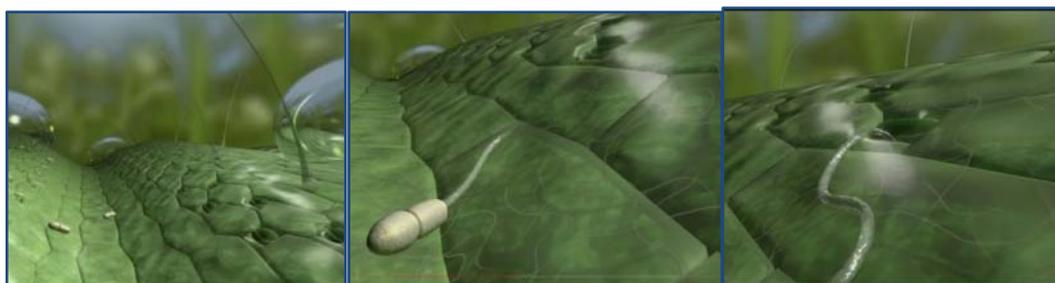


Рисунок 5. Заражение аскоспорами листьев растения

Происходит заражение растений. Гифы гриба проникают через устьица листа, и мицелий распространяется в ассимиляционной ткани. Визуально симптомы поражения сразу не видны. Должен пройти латентный период. Примерно через 21 день при высоких температурах

можно наблюдать развитие некротических пятен с пикнидами. Число пикнид постепенно увеличивается. В них происходит образование и созревание пикноспор (рисунок 6). Пикноспоры – бесполоя стадия размножения гриба. Распространение спор зависит от увлажнения (дождь, роса). Споры из пикнид выходят на поверхность листовой пластины (остеолий), капельки разбиваются ветром и разносятся на большие расстояния. Параллельно происходит заражение верхних ярусов растения-хозяина. За один сезон можно наблюдать несколько таких процессов. Обильные осадки с последующей сохраняющейся продолжительное время влажностью благоприятствуют спорообразованию, высвобождению спор из пикнид, а затем образованию некрозов на листьях. При этом оптимальный температурный диапазон равен +15 - +25°C [Агроном. Септориоз листьев пшеницы. Эл. ресурс]. В литературе имеются сведения, что вид *Z. tritici* лучше развивается при температуре +16 - +25°C [Eyal и др., 1987], *P. nodorum*/*P. avenae* - +12 - +26°C, то есть нижний предел на 4°C ниже, чем для *Z. Tritici*[Shipton, 1971; Babodoost, 1984]. В работе Зеленева Ю.В. [2019] было показано, что вид *P. nodorum* получает преимущественное развитие в годы с более влажной погодой во время вегетации пшеницы, в отличие от вида *Z. tritici*, который является более устойчивым к пониженным показателям влажности[Зеленева, 2019].

Таким образом, грибы - возбудители септориоза зерновых характеризуются большой экологической пластичностью и способностью быстро адаптироваться к разнообразным условиям. В их популяциях накапливаются и мутации, и рекомбинации, микроэволюционные процессы идут достаточно быстро.



Рисунок 6. Образование и распространение пикноспор

2. УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Особенности аграрного сектора регионов сбора инфекционного материала

Сельское хозяйство Российской Федерации является крупнейшим сектором экономики. Более 53% сельскохозяйственного производства приходится на растениеводство. Основные производители продукции сосредоточены в Северо-Кавказском, Поволжском, Западно-Сибирском, Центральном-Черноземном, Волго-Вятском, Центральном районах. На их долю приходится более 30% всей продукции растениеводства. Российская Федерация обладает обширными посевными площадями под пшеницей, рожью, ячменем, овсом, кукурузой, подсолнечником, соей и многими другими культурами. Более 20% посевных площадей отведено под кормовые культуры. В сельском хозяйстве занято около 9% населения страны [Бурда и др., 2021; Информационное агенство Зерно, эл. ресурс].

Центрально-Черноземный район

В связи со специализацией сельского хозяйства Центрально-Черноземного района и структурой его товарной продукции отрасли промышленности района, перерабатывающие сельскохозяйственное сырье, производят преимущественно продовольственные товары (4/5 валовой продукции). Это свидетельствует о том, что в структуре АПК района продовольственный подкомплекс - главный, а производство сырья для выпуска одежды и обуви носит подчиненный характер [Бурда и др., 2021].

На район приходится всего 6,3% сельскохозяйственных угодий России. В то же время он производит в разные годы от 9 до 12% зерна примерно 50% сахарной свеклы, 15-17% семян подсолнечника, 7-11% картофеля, 7-8% валового сбора овощей, 11-13% плодов и ягод. Производство основных видов продуктов растениеводства на душу населения в районе намного превышает средние показатели по РФ. Так, например, в расчете на 1

человека здесь производят зерна более 4 т (в среднем по России 600 кг) [Бурда и др., 2021].

Северо-Кавказский район

Многопрофильное высокотоварное сельское хозяйство - основа АПК Северного Кавказа. В сельском хозяйстве района из 35,5 млн. га земельных ресурсов используется почти 30 млн. га, или 84%. Пашня занимает 63% земельного фонда. Благоприятные почвенно-климатические условия обеспечивают выращивание 80 сельскохозяйственных культур. По площади посевов озимой пшеницы, кукурузы, риса, подсолнечника и самой низкой себестоимостью в стране производят Ростовская область, Краснодарский и Ставропольский края. В степной зоне доращивают гречиху, в засушливых регионах – просо, а на поливных землях Ростовской области, Краснодарского края и Дагестана – рис. Крупная база рисоводства создана на Кубани, где построен мощный водохозяйственный комплекс, позволивший оросить свыше 600 тыс. га земельных угодий и использовать их под посевы различных ценных технических культур [Куликова и др., 2018].

В структуре посевных площадей района ведущее место принадлежит зерновым – они занимают 58%, 30% занято под кормовыми культурами, 9% под техническими и 3% - картофелем и овощебахчевыми.

Зерновые культуры выращиваются повсеместно, но основными районами их возделывания служат Краснодарский и Ставропольский края и Ростовская область, где производится около 90% всего количества зерна. В посевах преобладает озимая пшеница, которая занимает около половины общей площади зерновых культур. Северный Кавказ – главный производитель кукурузы в Российской Федерации [Куликова и др., 2018].

Волго-Вятский район

Сельское хозяйство - многоотраслевое, но лишь частично обеспечивает потребности района. Ведущее место принадлежит животноводству (естественные луга и пастбища по долинам рек). Разводят крупный

рогатый скот, овец, свиней. Земледелие специализируется на производстве картофеля, на юге – выращивание зерновых и технических культур [Моретти и др., 2021].

Западно-Сибирский район

Западная Сибирь - один из важнейших районов зернового хозяйства и животноводства России. Главная отрасль сельского хозяйства - растениеводство. Основная культура - яровая пшеница. По площади посевных культур в Западной Сибири, а также в целом по России лидирует Алтайский край, где под посевными культурами находилось на 2005 год 5219,3 тыс га. Эта особенность обусловлена наличием здесь больших площадей плодородных земель и благоприятных почвенно-климатических условий. Но эти площади с каждым годом убывают, в основном, из-за опустынивания и засухи. Например, в 1990 году они составляли 6380 тыс га, спустя 5 лет уже 5832,6 тыс га и в 2000 году они составили всего 5344,9 тыс га. Так же Алтайский край - лидер в Западной Сибири по выращиванию картофеля, хотя в целом наблюдается тенденция к снижению посевов: пик пришелся на 1995 год(104,1 тыс га), а к 2005 году посевные площади сократились на 16,4 тыс га. Кроме того, в Горном Алтае разводят лошадей [Моретти и др., 2021].

Центральный район

Агропромышленный комплекс Центрального района дает примерно 50% всей сельскохозяйственной продукции Нечерноземной зоны России [Моретти и др., 2021].

Анализ официальных данных Росстата показал, что агропромышленный сектор обладает огромным потенциалом роста [<https://rosstat.gov.ru/>]. Сельскохозяйственное производство в России ежегодно увеличивалось на протяжении последнего десятилетия. 2022 год не стал исключением, несмотря на снижение динамики примерно до 1,5%, поскольку аграрный сектор пострадал от разрушительных последствий пандемии. Производство отдельных культур достигло исторических

рекордов. По данным Министерства сельского хозяйства, российские организации производят 10-13% всего мирового экспорта зерна и 20-23% мирового экспорта пшеницы [<https://rosstat.gov.ru/>]. Этот объем производства делает Россию крупнейшим в мире гигантом по экспорту пшеницы и зерна. В дополнение к этому, Россия входит в десятку лидеров по экспорту многих других культур. По данным Росстата [<https://rosstat.gov.ru/>], экспорт продовольствия принес стране рекордные 30 миллиардов долларов в 2020 году. Кроме того, за последние десять лет Россия добилась значительного прогресса в области качества и безопасности пищевых продуктов, что уже признано многими странами. По общепринятым показателям продовольственной безопасности страна стабильно входит в тройку лидеров в мире.

Таким образом, сельскохозяйственный сектор в России имеет огромный потенциал для развития. С экологической точки зрения ресурсы, которыми обладает Российская Федерация, открывают возможности для устойчивого сельского хозяйства, которое может принести пользу всему миру в ближайшем будущем. Однако недостаточный уровень инвестиций и инноваций приводит к замедлению этого развития.

2.2 Материалы и методы исследований

Изучение видового состава возбудителей септориозов зерновых культур

Изучение видового состава и внутривидовой структуры популяции возбудителей септориоза начинали с обследования посевов зерновых колосовых культур. Для получения объективной картины распространения болезни маршруты обследований располагали равномерно по площади поля. В изучение включали не менее 10% полей, типичных для исследуемого региона по местоположению, плодородию, агротехнике, высеваемым сортам. В ходе обследований проводили диагностику

заболевания по внешним признакам проявления и отбирали образцы пораженных растений. С исследуемого поля собирали не менее 30 образцов (пораженных листьев, колосьев) с типичными признаками болезни. Собранный материал гербаризировали, складывали в пакеты, снабжали этикеткой с указанием места, даты сбора, фазы развития, сорта и сохраняли в холодильнике для последующего анализа в лабораторных условиях [Санин, 2002].

Для определения видового состава собранные образцы микроскопировали. Небольшой кусочек (5×5 мм) пораженной ткани с плодовыми телами помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали покровным стеклом и просматривали при малом увеличении микроскопа. Через некоторое время наблюдали выход пикноспор. По форме и размеру выделившихся спор определяли вид возбудителя [Пидопличко, 1978]. Анализировали не менее 30 проб с каждого инфекционного образца.

На основании полученных данных устанавливали частоту встречаемости отдельных видов септориоза по формуле:

$$N = A/B \times 100 (\%),$$

где N - частота встречаемости вида, %;

A - число случаев, в которых отмечен данный вид септориоза;

B - общее число случаев, в которых встречался как данный вид, так и другие.

Изучение внутривидовой структуры возбудителей септориозов зерновых культур

После идентификации видов септориоза проводили изучение внутривидовой дифференциации по разработанным ранее методикам [Санина, 1991; Плахотник и др. 2013]. Выделение изолятов в чистую культуру осуществляли в стерильном боксе. Изучение развития

возбудителей септориозов проводили на агаризованной среде картофельно-глюкозного состава [Санина, Анциферова, 1989].*

Моноспоровые изоляты гриба выделяли методом «штрихов». Осматривая гербарный материал, вырезали кусочки ткани с типичными поражениями. Отобранные кусочки промывали водопроводной водой, затем многократно в стерильной воде и подсушивали фильтровальной бумагой. Поверхностно стерилизовали путем погружения в 50%-ный спирт на 20 секунд, после чего промывали в стерильной воде. С помощью микроскопа или лупы на пораженной ткани находили участок с пикнидами, препаровальной иглой извлекали одну пикниду, помещали на предметное стекло в каплю стерильной воды и через некоторое время, после того как из нее выделялись споры, полученную споровую суспензию с помощью бактериологической петли высевали штрихом на питательную среду. Через 7-8 суток единичные колонии, произошедшие из одной конидии, пересеивали в отдельные чашки Петри и помещали в термостат при $t = +21^{\circ}\text{C}$ [Санина, Анциферова, 1989].

За культурами вели наблюдения, отмечая изменение роста и начало спороношения. Описание культурально-морфологических признаков изолятов возбудителей септориоза проводили на 20-й (*P. nodorum*, *P. avenae*, *S. trititicola*) и 30-й (*Z. tritici*) день. Отмечали размер (для *Z. tritici*), характер строения и окраску колоний, а также интенсивность споруляции гриба.

Для изучения показателя скорости роста колоний *Z. tritici* на КГА измеряли диаметр колоний на 30 день, согласно методическим рекомендациям, и классифицировали на медленно- (< 10 мм), средне- (10...15 мм) и быстрорастущие (> 15 мм).

* Картофель – 200 г.

Глюкоза – 20 г.

Агар – 20 г.

Дистиллированная вода – 1000 мл.

Промытый и очищенный картофель нарезают тонкими ломтиками, кипятят в 1 л воды в течение 45 минут, фильтруют, добавляют глюкозу и агар. Стерилизуют при 1 атм в течение 30 мин.

По интенсивности споруляции на питательной среде изоляты грибов разделяли на три группы: I–слабоспорулирующие, II–среднеспорулирующие, III–высокоспорулирующие (таблица 1). Брли пробу участка колонии пробочным сверлом №1 (диаметр 0,7 см) и помещали в химические стаканы, заливая точно измеренным количеством воды.

Пробы настаивали в воде в течение часа, затем интенсивно перемешивали. В образовавшейся суспензии определяли количество спор с помощью камеры Горяева, затем пересчитывали количество спор в пробе по формуле [Пыжикова и др., 1988]:

$$A = M \times 2500 \times V \times 100/n \times 38,5$$

где A - число спор;

M-подсчитанное количество спор в 100 больших квадратах камеры Горяева;

n - число выбоек;

38,5 - площадь сверла;

2500 и 100 - вспомогательные величины для пересчета количества спор на 1 см² площади колоний;

V - объем воды, залитой в сосуд, мл.

Таблица 1

Характеристика изолятов видов – возбудителей септориозов зерновых культур по спорулирующей способности *in vivo*

[Пыжикова и др., 1988]

Группы изолятов	Характеристика репродуктивной активности изолятов	Количество спор на 1 см ² площади колонии	
		<i>Parastagonospora avenae</i> ; <i>Parastagonospora nodorum</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>
I	слабоспорулирующая	< 1млн.	< 10млн.
II	среднеспорулирующая	1-10 млн.	10-50 млн.
III	высокоспорулирующая	> 10 млн.	> 50 млн.

Описывали внешний вид и характер строения колоний моноконидиальных изолятов (таблица 2, 3, 4).

Таблица 2

Морфологические типы колоний изолятов *Z. tritici*, выращенных на КГА

[Санина, Анциферова, 1989]

Тип колонии	Характеристика фенотипа
I Дрожжеподобный	1а - розовые, грязно-розовые, иногда с черным цветом; поверхность гофрированная
	2б - черные гофрированные
	3в - черные с розовой каймой
II Смешанный или стромоподобный	4а - темные; центр дрожжеподобный темный; край мицелиальный
	5б - центр дрожжеподобный, розовый, грязно-розовый; край мицелиальный
	6в - серые; центр дрожжеподобный, грязно-розовый
	7г - центр мицелиальный; край гофрированный, черный
	8д - центр мицелиальный; край гофрированный, желтый
III Мицелиальный	9а - белые до серого
	10б – черные

Морфологические типы колоний изолятов *Parastagonospora nodorum*
(чистая культура на картофельно-глюкозном агаре)

[Санина, 1991; Коломиец и др., 2017]

Тип колоний	Характеристика фенотипа
I Светлый	а - розовый гранулированный мицелий, редко – воздушный; пикнид много
	б - серая, шерстистая или шерстисто-порошистая поверхность; пикнид много
	в - поверхность белая, светло-серая, ватообразная, неровная, складчатая или бугристая; пикнид мало или они отсутствуют
II Темный	а - мицелий темно-бурый, гранулированный, редко-воздушный; пикнид много
	б - поверхность темно-бурая, шерстистая или шерстисто-порошистая; пикнид много
	в - черная, бурая, паутинная, гладкая поверхность; пикнид мало
III Смешанный	Поверхность мицелия бурого цвета в середине, светлая по периферии, шерстистая; пикнид много

Морфологические типы колоний изолятов *Parastagonospora avenae*
(чистая культура на картофельно-глюкозном агаре)

[Санина, 1991; Коломиец и др., 2017]

Тип колоний	Характеристика фенотипа
I однородный	1а – колонии белые, розовые, бело-розовые, бежевые, кремовые, мицелий густой, плотный, воздушный; пикнид мало
	2б – колонии розовые, серые, гранулированные, мицелий редкий; пикниды есть
	3в – колонии розовые, светло-розовые, мицелий плотный, войлочный; пикнид мало
	4г – колонии темно-серые, оливковые, кремовые, мицелий плотный, в центре – воздушный и редкий по краям; пикниды внутри субстрата
	5д – колонии серые, оливковые, мицелий в центре скудный и плотный или воздушный по краям; пикнид много
II смешанный (зональный)	6а – колонии в центре розовые, мицелий скудный, по краям колонии белые; пикнид мало
	7б – в центре колонии белые, розовые, серые, гранулированные, по краям – серые, темно-серые с плотным войлочным мицелием; пикниды есть
	8в – колонии в центре темно-серые, мицелий плотный, войлочный, края – светло-серые, белые; пикниды внутри субстрата
	9г – в центре колонии светло-серые, белые, по краям – оливковые, темно-серые, мицелий скудный; пикнид мало
	10д – колонии в центре грязно-розовые, гранулированные по краям, темно-серые, мицелий скудный, паутинный; пикнид мало

Изоляты, обладающие стабильностью и высокой споруляцией, отбирали для дальнейших исследований, отсевая их в пробирки на скошенный агар. Пробирки в течение 7-10 суток держали в термостате при $t = 22^{\circ}\text{C}$, после чего помещали в холодильник ($+4^{\circ}\text{C}$) на хранение.

*Изучение популяций грибов рода *Parastagonosporaspp* по генам эффекторам *ToxA*, *Tox1* и *Tox3**

Геномная ДНК грибов рода *Parastagonosporaspp* была выделена из чистой культуры моноконициальных изолятов, полученной на картофельно-глюкозном агаре (КГА), стандартным методом СТАВ/хлороформ [Doyle, Doyle 1990] (Приложение 1).

Аmplификацию геномной ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси (67 mM Трис-НСl pH 8,8; 3mM MgCl₂; по 200 мкМ каждого dNTP; 10 pM/мл праймера; 25 (от 2 до 50) нг геномной ДНК и 0,5 ед. л Taq-полимеразы).

Аmplифицированные фрагменты разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле, в 1 X TBE буфере (pH 8,2), гель окрашивали бромистым этидием при напряженности 100 V в течение 2 часов и фотографировали в ультрафиолетовом свете (Приложения 2, 3). Для оценки размера фрагментов использовали ДНК маркер Step100plus (Биолабмикс), рекомендованный в качестве стандарта для оценки длины и количества двуцепочечных молекул ДНК размером от 50 до 1500 п.н. в агарозном геле. Полученные электрофореграммы фотографировали и обрабатывали на компьютере.

Анализ проводили с использованием праймеров представленных в таблице 5.

ПЦР-скрининг на присутствие генов *SnTox1* и *SnTox3* проводили по методике Gaoetal. [2015] с использованием пар праймеров *SnTox1-cF/ SnTox1-cR* и *SnTox3-cF/ SnTox3-cR* соответственно.

Условия ПЦР: начальная денатурация при 94 °С в течение 4 минут, затем 30 циклов при 94 °С в течение 30 секунд, 60 °С в течение 30 секунд, 72 °С в течение 3 минут, последний этап удлинения при 72 °С в течение 10 минут.

SnToxA детектировали с помощью ПЦР с использованием праймеров для связывания *ORFToxATA51F* и *TA52R* [Andrieetal., 2007].

Условия ПЦР: начальная денатурация при 94 °С в течение 3 минут, затем 30 циклов при 94 °С в течение 30 секунд, 58 °С в течение 30 секунд, 72 °С в течение 30 секунд, последний этап удлинения при 72 °С в течение 7 минут.

Для контроля ДНК на способность к амплификации использовали праймеры *CHS-79F* и *CHS-354R* на ген «домашнего хозяйства» хитин-синтетазы *CHS-1*, дающие в ПЦР продукты амплификации размером 275 п.н. [Andrieetal., 2007]. Все образцы ДНК, выделенные из коллекционных моноконидиальных штаммов и взятых в испытание, подтвердили присутствие гена *CHS-1*.

Условия ПЦР: начальная денатурация при 94 °С в течение 1 минуты, затем 30 циклов при 94 °С в течение 45 секунд, 58 °С в течение 30 секунд, 72 °С в течение 1 минуты, 30 секунд, последний этап удлинения при 72 °С в течение 7 минут.

Список праймеров для ПЦР, использованных в данном
исследовании.

№	Название праймера	Последовательность 5'-3'	Ссылка на литературный источник	Размер диагностического фрагмента – продукта амплификации маркера, п.н.
1	<i>Sn Tox 1 cF</i>	ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT	Gao et al. 2015	500
2	<i>Sn Tox 1 cR</i>	TGTGGCAGCTAACTAGCACA		
3	<i>Sn Tox 3 cF</i>	CTCGAACCACGTGGACCCGGA		600
4	<i>Sn Tox 3 cR</i>	CTCCCCTCGTGGGATTGCCCC ATATG		
7	<i>CHS-79F</i>	TGGGCAAGGATGCTTGGAAGA AG	Andrie et al. 2007	275
8	<i>CHS-354R</i>	TGGAAGAACCATCTGTGAGAG TTG		
9	<i>TA51 F</i>	GCGTTCTATCCTCGTACTTC		573
10	<i>TA52 R</i>	GCATTCTCCAATTTTCACG		

3. ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДАМИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Всего в 2022 г. было собрано и проанализировано 87 инфекционных образцов озимой, яровой пшеницы, тритикале и овса с симптомами септориозов из 10 областей Европейской части России (табл. 6).

Таблица 6

Происхождение использованных в работе образцов зерновых культур

Происхождение	Всего образцов	Озимая пшеница	Яровая пшеница	Тритикале	Овес
Краснодарский край	3	2	1	0	0
Воронежская область	2	2	0	0	0
Саратовская область	16	8	3	5	0
Пензенская область	1	1	0	0	0
Тамбовская область	52	35	17	0	0
Белгородская область	1	1	0	0	0
Кабардино-Балкарская Республика	1	1	0	0	0
Липецкая область	3	3	0	0	0
Республика Калмыкия	1	0	0	0	0
Алтайский край	8	1	4	1	2
Итого	88	54	25	6	2

В 2022 году был проанализирован инфекционный материал из Саратовской области в количестве 16 образцов, из Тамбовской – 52 образца и из Алтайского края – 8. В результате лабораторной диагностики, в чистую культуру было выделено 53 моноконидиальных изолятов из Тамбовских популяций, 21 из Саратовских и 9 из Алтайских. Лабораторная диагностика позволила провести изучение видового состава возбудителей септориозных инфекций в разных регионах России (рисунок 7).

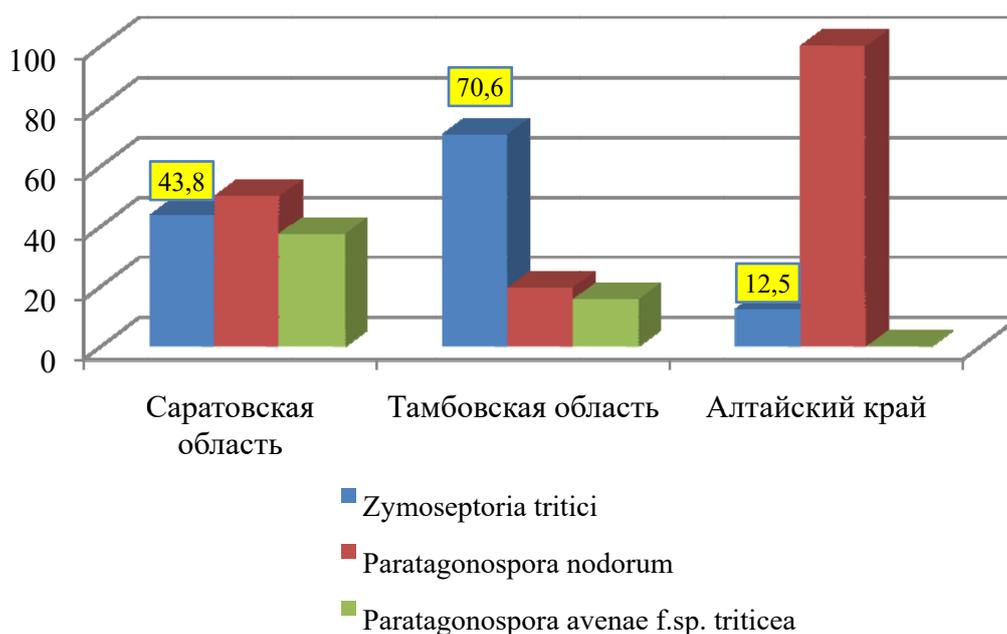


Рисунок 7. Встречаемость видов – возбудителей септориозов

Вид *P.nodorum* был зафиксирован чаще в изученных образцах из Саратовской области и Алтайского края. Его частота составила 50% и 100% соответственно. На втором по распространенности в этих регионах встречается был *Z. tritici*. Его встречаемость - 43,8% и 12,5% соответственно.

В Тамбовской области *Z. tritici* преобладал над остальными видами и имел частоту - 70,6%. На втором месте по распространению находился вид *P.nodorum* (19,6%).

P. avenae f.sp. triticea в образцах из Саратовской и Тамбовской областях занимал третье место в патогенном комплексе септориозных

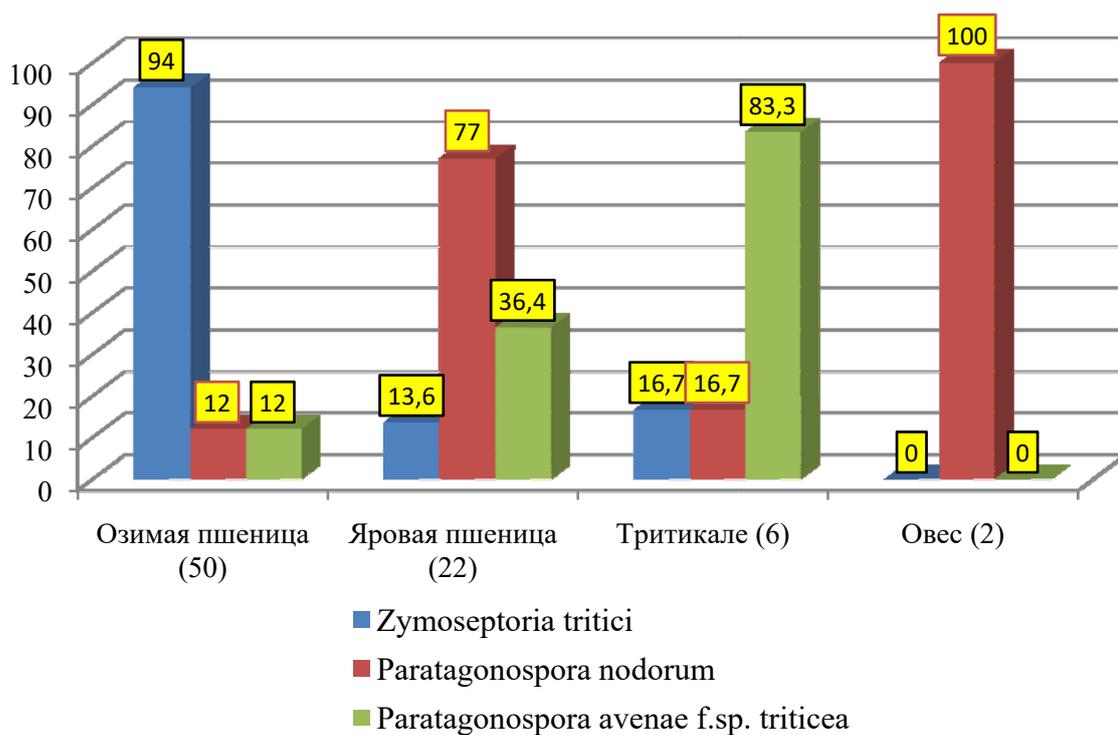
пятнистостей. Уступая видам *Z. tritici* и *P. nodorum*. Среди образцов из Алтайского края данный вид зафиксирован не был.

Также был проанализирован инфекционный материал из Краснодарского края, Воронежской, Пензенской, Белгородской и Липецкой областей, Кабардино-Балкарская республики, Калмыкии. Однако количество инфекционных образцов было не большим: от одного до трех. На всех образцах был зафиксирован только вид один вид - *Z. tritici* (таблица 7).

Таблица 7

Распространение *Z. tritici* на инфекционных образцах из различных регионов России

Место сбора инфекционного образца	Количество сортообразцов пшеницы с идентифицированным видом <i>Z. tritici</i>	Регистрационный номер
Краснодарский край	оз. мягк. пшеница Гомер	1-22
	пшеница	248-22
	оз. мягк. пшеница Гомер	249-22
Воронежская область	оз. мягк. пшеница Безостая 1	106-22
	оз. мягк. пшен. Бзальт	107-22
Пензенская область	оз. пшеница	69-22
Белгородская область	оз. пшеница	216-22
Кабардино-Балкарская республика	оз. пшеница	242-22
Липецкая область	пшеница, Совербаш	243-22
	пшеница, Гомер	244-22
	пшеница, Скипетр	245-22
Калмыкия	пшеница	247-22



*Примечание: в скобках указано количество проанализированных сортов образцов

Рисунок 8. Встречаемость видов септориоза в зависимости от вида хозяина

На рисунке 8 приводятся результаты зависимости встречаемости вида возбудителя септориоза в зависимости от видовой принадлежности растения-хозяина. *Z. tritici* отмечался чаще на сортах озимой пшеницы. На сортах яровой пшеницы и овсе чаще отмечался вид *P. nodorum*, на сортах тритикале *P. avenae f.sp. triticea*.

4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-ЭФФЕКТОРОВ *SNTOXА*, *SNTOX1*

И SNTOX3

УВИДОВ *PARASTAGONOSPORANODORUM* И *PARASTAGONOSPORA AAVEN*

AE

Многие фитопатогенные грибы обладают способностью выделять эффекторы, способствующие вирулентности фитофага. Эти эффекторы преимущественно белкового происхождения, они секретируются в апопласт клетки-хозяина, проникают в цитоплазму, где начинают манипулировать биологическими процессами, способствуя колонизации растения фитопатогеном [LoPresti и др., 2015].

В ответ на действие эффекторов, растения развили врожденный иммунитет, благодаря которому включаются определенные защитные процессы. Рецепторы распознают эффекторы фитопатогена, что приводит к эффекторному иммунитету. Активируются рецепторы распознавания (PRR), они идентифицируют ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны (PAMP), в результате чего возникает иммунитет [Jones, Dangl, 2006]. Как правило, реакция резистентности приводит к запрограммированной гибели клеток вокруг очага инфекции (PCD) через локализованную гиперчувствительную реакцию (HR). Она возникает в результате физиологических процессов, в том числе накопления активных форм кислорода, перекисное окисление липидов, отложение каллозы в местах инфицирования и других процессов [Dodds, Rathjen, 2010].

Биотрофам требуется живая клетка для извлечения питательных веществ. Реакция PCD менее эффективна против некротрофических патогенов. Они специально выделяют некротрофические эффекторы, которые нацелены на гены хозяина, чтобы вызвать некроз, обеспечивающий возбудителя питательными веществами [Faris, Freisen, 2020].

Грибы рода *Parastagonospora* известны своей способностью синтезировать некротрофные эффекторы (necrotrophic effectors – NEs), в том числе специфичные к хозяину токсины (host selective toxins – HSTs).

У вида *P. nodorum* идентифицировано восемь генов, кодирующих NEs, комплементарных девяти генам чувствительности пшеницы (*Snn*): *SnToxA/Tsn1*, *SnTox1/Snn1*, *SnTox2/Snn2*, *SnTox3/Snn3-B1/Snn3-D1*, *SnTox4/Snn4*, *SnTox5/Snn5*, *SnTox6/Snn6* и *SnTox7/Snn7* [Duba и др., 2018].

Изначально предполагалось, что *SnTox2*, *SnTox6* и *SnTox7* - три разных эффекторных гена, нацеленных на три отдельных гена чувствительности, Richards с коллегами [Richards и др., 2022] недавно показали, что эти три эффектора на самом деле один и тот же ген, который был обозначен как *SnTox267*. Этот один ген нацеленных на три отдельных гена чувствительности хозяина: *Snn2*, *Snn6* и *Snn7*.

В настоящий момент клонированы четыре некротрофных эффекторных гена *P. nodorum*: *SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3* и *SnTox267*. Показано, что данные гены также характерны и для вида *P. avenae* [Freisen, Faris, 2021].

В 2022 г. было выделено и проанализировано 170 моноконидиальных изолятов, полученных с инфекционных образцов 17 сортов яровой пшеницы, высеянных на опытном поле Среднерусского филиала ФНЦ им. И.В. Мичурина (Тамбовская область).

Ген *SnTox1* был выявлен среди изолятов, полученных с 6 сортов яровой пшеницы. Наличие гена отмечено у изолятов *P. nodorum* с сортообразцов Курская 2038 и Тулайковская 100. Наличие гена *SnTox1* отмечено у моноконидиальных изолятов *P. avenae* f. sp. *triticea*, выделенных с инфекционного материала сортов яровой пшеницы Краснокутка 10, Кинельская 6, Тулайковская 100 и Экада 109 (рис. 9, табл. 8).

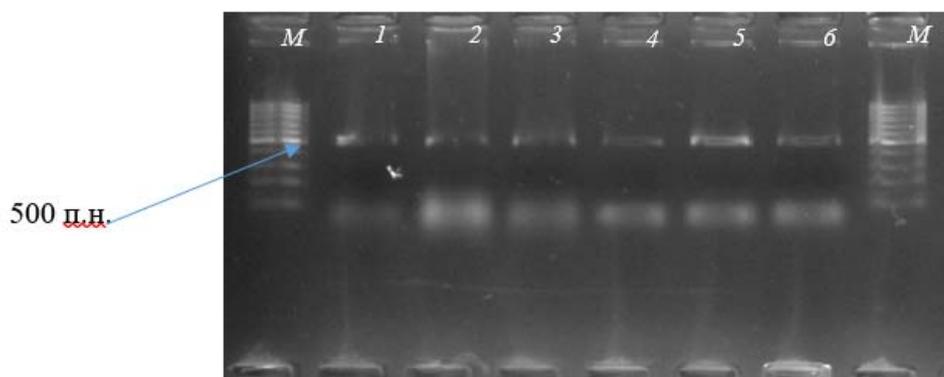


Рисунок 9. Продукты амплификации с праймерами *SnTox1-cF/SnTox1-cR*, специфичными для гена *SnTox 1* (номера изолятов слева: 137-22-Р.н.; 150-22-Р.н.; 136-22-Р.ав.т.; 134-22-Р.ав.т.; 150-22-Р.ав.т.; 163-22-Р.ав.т.).

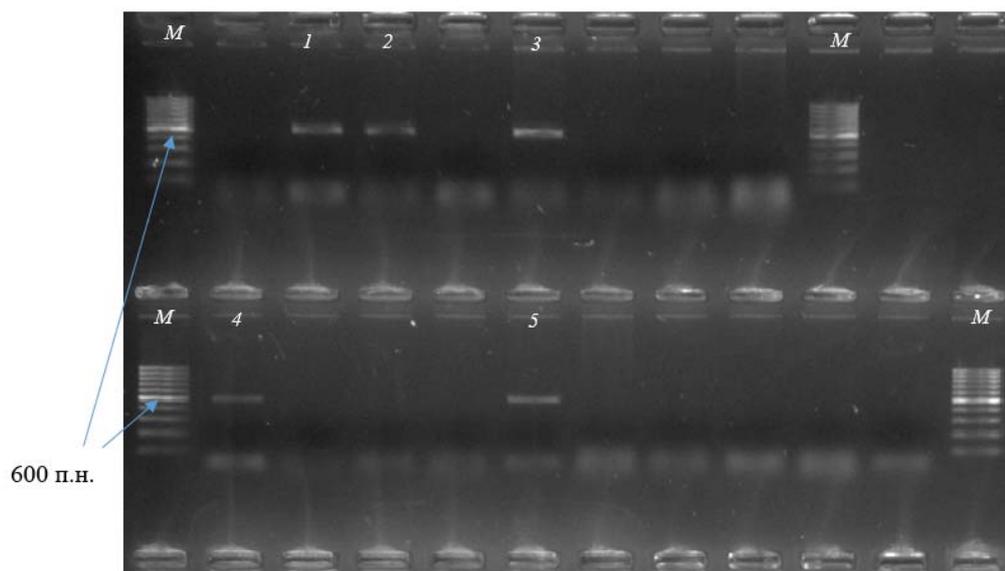


Рисунок 10. Продукты амплификации ПЦР с праймерами *SnTox3-cF/SnTox3-cR*, специфичными для гена *SnTox3* (номера изолятов: 137-22-Р.н.; 148-22-Р.н.; 185-22-Р.н.; 163-22-Р.ав.т.; 185-22-Р.ав.т.).

Наличие гена *SnTox3* выявлено среди изолятов вида *P. nodorum*, полученных из растительных образцов с сортов Курская 2038, Союз 1 и Воевода. Присутствие гена *SnTox3* отмечено у изолятов *P. avenae* f. *sp. triticea*, полученных с сортов Экада 109 и Воевода (рис. 10, табл. 8).

Ген *SnToxA* был выявлен среди изолятов *P. nodorum*, полученных с трех сортов яровой пшеницы: Союз 1, Пирамида и Воевода (рис. 11, табл. 8).

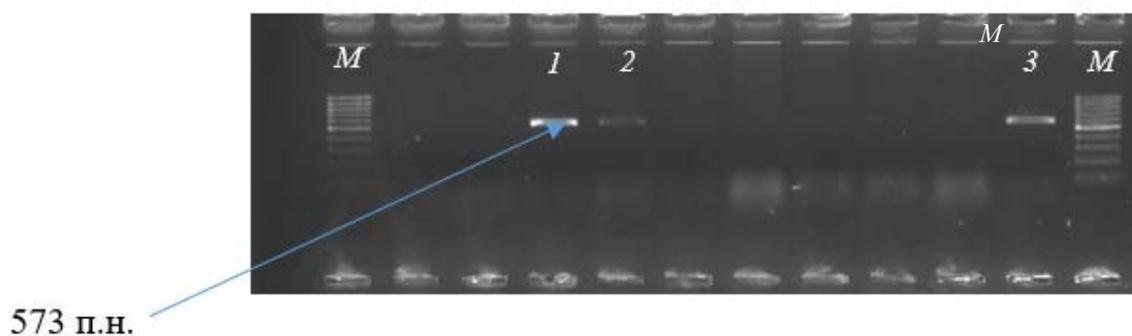


Рисунок 11. Продукты амплификации с праймерами *TA51 F/TA52 R*, специфичными для гена *SnToxA* (номера изолятов слева: 148-22-Р.н.; 149-22-Р.н.; 185-22-Р.н.)

Встречаемость генов, кодирующих NEs в Тамбовской популяции вида *Parastagonosporanodorum* составила: *SnToxA* – 30%, *SnTox1* – 20%, *SnTox3* – 30%; в популяции вида *Parastagonosporaavenae* f. *sp. triticea*: *SnToxA* – 0%, *SnTox1* – 57,1% , *SnTox3* – 30% (таблица 8).

Моноконициальные изоляты *Parastagonospora* spp. из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР с идентифицированными генами *SnToxA*, *SnTox1* *SnTox3*

Вид гриба	№ изолята	Сорт-хозяин яровой пшеницы	<i>SnToxA</i>	<i>SnTox1</i>	<i>SnTox3</i>
<i>Parastagonospora nodorum</i>	137-22- P.n.	Курская 2038	-	+	+
	145-22- P.n.	Саратовская 29	-	-	-
	148-22- P.n.	Союз 1	+	-	+
	149-22- P.n.	Пирамида	+	-	-
	150-22- P.n.	Тулайковская 100	-	+	-
	156-22- P.n.	Л 400	-	-	-
	157-22- P.n.	Л 503	-	-	-
	161-22- P.n.	Фаворит	-	-	-
	175-22- P.n.	Валентина	-	-	-
	185-22- P.n.	Воевода	+	-	+
Встречаемость генов %			30	20	30
<i>Parastagonospora avenae</i> f. <i>sp.triticea</i>	136-22-P.av.t.	Краснокутка 10	-	+	-
	134-22-P.av.t.	Кинельская 6	-	+	-
	150-22-P.av.t.	Тулайковская 100	-	+	-
	161-22-P.av.t.	Фаворит	-	-	-
	163-22-P.av.t.	Экада 109	-	+	+
	185-22-P.av.t.	Воевода	-	-	+
	186-22-P.av.t.	Гранни	-	-	-
Встречаемость генов %			0	57,1	28,6
Встречаемость генов (в популяциях двух видов), %			17,6	35,3	29,4

Таким образом, с использованием молекулярных маркеров проведена идентификация генов, кодирующих NEs у двух видов *Parastagonospora* spp. популяций Тамбовской области Российской Федерации.

Подобные исследования были проведены у изолятов вида *P.nodorum* алтайской популяции 2022 года. Результаты представлены в таблице 9 и на рисунке 12.

Таблица 9

Происхождение и количество проанализированных моноконидиальных
 изолятов *Parastagonospora nodorum* алтайской популяции в 2022 г.

№ п/п	Название изолятов	Число изолятов гриба проанализированных методом ПЦР	Происхождение	Растение - хозяин
1	110-22-Р.н.	5	Алтайский край Смоленский р-он ООО Житница	яровая мягкая пшеница КВС Буран
2	112-22-Р.н.	5	Алтайский край Зональный р-он Агрофирма «НИВА»	озимая мягкая пшеница Скипетр
3	113-22-Р.н.	5	Алтайский край Смоленский р-он ООО Житница	яровой овес
4	116-22-Р.н.	5	Алтайский край Зональный р-он Агрофирма «НИВА»	яровой овес Сибирский геркулес
5	117-22-Р.н.	5	Алтайский край Смоленский р-он ООО"Агро - Сибирь"	яровая мягкая пшеница КВС Буран
6	118-22-Р.н.	5	Алтайский край Целинный р-он	яровая мягкая пшеница КВС Буран
7	122-22-Р.н.	5	Алтайский край Целинный р-он	тритикале
8	123-22-Р.н.	5	Алтайский край Каменский р-он ООО"Приозерье"	Яровая мягкая пшеница КВС Аквилон
Всего		40		

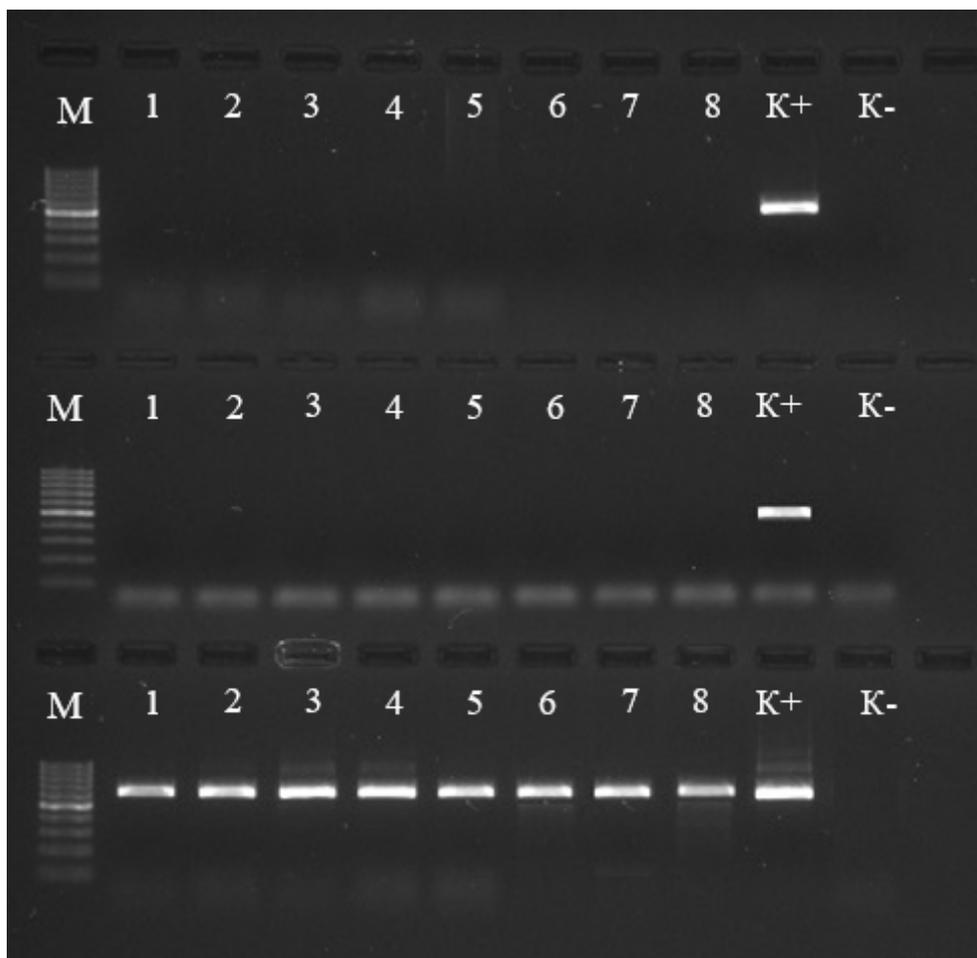


Рисунок 12. Электрофореграммы продуктов амплификации маркеров TA51/52 – первая, SnTox1-с – вторая, SnTox3-с – третья дорожка у изолятов *Parastagonospora nodorum* алтайской популяции (Размер ампликонов 573, 500, 600 пн соответственно). Номера, указанные для образцов, соответствуют изолятов в таблице 7.

Установлено, что изоляты алтайской популяции вида *P. nodorum*, находящиеся в испытании не содержали гены *ToxA* и *ToxI*. Зато все проанализированные изоляты содержали ген *Tox3*.

5. ВИРУЛЕНТНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *PARASTAGONOSPORA NODORUM* АЛТАЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

В изучение вирулентных свойств популяции были включены 8 моноконициальных изолятов. Параллельно закладывали четыре эксперимента. Первый – сорта пшеницы заражались инокулюмом, включающим смесь пикноспор изолятов 110-22-Р.н., 117-22-Р.н., 118-22-Р.н., 123-22-Р.н., полученных с яровой пшеницы. Во втором эксперименте задействовали инокулюмом, включающий споры изолята 112-22-Р.н. – с озимой пшеницы; в третьем – споры изолятов 113-22-Р.н., 116-22-Р.н., полученные с овса. Четвертый эксперимент включал инфекционный материал изолята, выделенного с тритикале - 122-22-Р.н. Проявление некротических пятен на листьях отмечали на 7 сутки после инокуляции. Основной учет проводили на 12 день. Полученные результаты представлены в таблице 8, и приложении 4.

Таким образом, изоляты с *P. nodorum*, полученные с яровой (110-22-Р.н., 117-22-Р.н., 118-22-Р.н., 123-22-Р.н.) и озимой пшеницы (112-22-Р.н.) проявили себя как вирулентные при заражении большинства сортов пшеницы. Изолят, полученный с тритикале (122-22-Р.н.) проявил вирулентность при заражении сортов яровой пшеницы и авирулентность при заражении сортов озимой пшеницы. Изоляты, полученные с овса (113-22-Р.н., 116-22-Р.н.) были патогенны для сортов пшеницы, но обладали авирулентностью.

Анализ вирулентности алтайской популяции *Parastagonospora nodorum* (средний балл \pm станд.отклонение)

Название сорта пшеницы	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Эксперимент 4
	Название изолята / растение-хозяин			
	110-22-Р.п., 117-22-Р.п., 118-22-Р.п., 123-22-Р.п. / яровая пшеница	112-22-Р.п. / озимая пшеница	113-22-Р.п., 116-22-Р.п. / овес	122-22-Р.п. / тритикале
1	2	3	4	5
<i>Озимая пшеница</i>				
Безенчукская 380	3 \pm 0,45	4 \pm 0,55	2 \pm 1,10	2 \pm 0,45
Бирюза	3 \pm 0,55	4 \pm 0,45	1 \pm 0,45	2 \pm 0
Звонница	3 \pm 0,84	3 \pm 0,55	1 \pm 0,45	2 \pm 0
Изюминка	3 \pm 0	3 \pm 0,00	2 \pm 0,45	2 \pm 0,55
Инна	3 \pm 0,45	3 \pm 0,55	2 \pm 0,89	3 \pm 0
Косовица	3 \pm 0,55	3 \pm 0	3 \pm 0,55	2 \pm 0,45
Лагуна	3 \pm 0,55	3 \pm 0,55	2 \pm 0,55	2 \pm 0,55
Латыневка	2 \pm 0	3 \pm 0,55	2 \pm 0,89	2 \pm 0,55
Липецкая звезда	2 \pm 0,45	2 \pm 0,00	1 \pm 0	1 \pm 0,89
Льговская 167	3 \pm 0,55	3 \pm 0,45	2 \pm 0,45	3 \pm 0
Мироновская 100	2 \pm 0,55	3 \pm 0	1 \pm 0	2 \pm 0,55
Мироновская 808	2 \pm 0,45	3 \pm 0,55	1 \pm 0,45	1 \pm 0,45
Московская 39	4 \pm 0,55	3 \pm 0,71	2 \pm 0,55	3 \pm 0,55
Московская 40	2 \pm 0,45	3 \pm 0	2 \pm 0,55	3 \pm 0
Престиж	3 \pm 0,55	2 \pm 0,55	2 \pm 0,55	3 \pm 0,45
Синтетик	1 \pm 0,55	1 \pm 0,45	1 \pm 0	2 \pm 0,55
Дон 93	1 \pm 0,55	1 \pm 0	1 \pm 0,55	2 \pm 0
Скипетр	1 \pm 0,55	2 \pm 0,55	1 \pm 0	2 \pm 0,45
Льговская 4	3 \pm 0,45	3 \pm 0,55	2 \pm 0,55	3 \pm 0
Стеднее значение	3 \pm 0,84	3 \pm 0,81	2 \pm 0,6	2 \pm 0,63
<i>Яровая пшеница</i>				
Беянка	3 \pm 0	3 \pm 0,55	2 \pm 0,45	2 \pm 0
Безенчукская 182	3 \pm 0	3 \pm 0,55	3 \pm 0,55	2 \pm 0,55
Воронежская 7	2 \pm 0,45	2 \pm 0,45	2 \pm 0,55	3 \pm 0,55
Воронежская 14	3 \pm 0,55	3 \pm 0,45	2 \pm 0	3 \pm 0
Жница	3 \pm 0,55	3 \pm 0,55	2 \pm 0,55	3 \pm 0,45
Кинельская 6	1 \pm 0,45	2 \pm 0,84	2 \pm 0	2 \pm 0
Лебедушка	2 \pm 0,45	2 \pm 0,45	2 \pm 0,45	3 \pm 0,55

Продолжение табл. 10				
1	2	3	4	5
Мульти 6 R	$3 \pm 0,55$	$3 \pm 0,55$	$2 \pm 0,45$	$2 \pm 0,55$
Тулайковская 5	3 ± 0	$3 \pm 0,00$	$2 \pm 0,84$	$3 \pm 0,55$
Фаворит	3 ± 0	$3 \pm 0,45$	$2 \pm 0,45$	3 ± 0
Удача	3 ± 0	$3 \pm 0,89$	$2 \pm 0,55$	$3 \pm 0,45$
Курская 2038	3 ± 0	$3 \pm 0,45$	$3 \pm 0,55$	3 ± 0
Среднее значение	$3 \pm 0,65$	$3 \pm 0,45$	$2 \pm 0,4$	$3 \pm 0,49$

*Примечание: изоляты, заразившие пшеницу на 3-4 балла, относили к вирулентным, на 0-2 балла - к авирулентным

6. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТИПОВ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ ГЕНА

Tsn1/tsn1 МЕТОДОМ ПЦР

Генотипирование образцов пшеницы с использованием молекулярного маркера было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсину *PtrToxA*. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п.н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину *PtrToxA* у четырех образцов озимой пшеницы – Латыневка, Дон 93, Синтетик и Лагуна (14,3% от изученных) и контроля Glenlea, носителя гена *Tsn1* (таблица 9, рисунок 11) Генотипы остальных 24 сортов озимой пшеницы несут рецессивную аллель гена *tsn1* (85,7% от изученных) (таблица 10, рисунок 12).

Таблица 11

Характеристика генотипов сортов озимой мягкой пшеницы по наличию гена *Tsn1/tsn1*

№ п/п	Сорт	Наличие диагностического фрагмента маркера <i>Xfcp623</i> (<i>Tsn1/tsn1</i>)
1	2	3
1	Липецкая звезда	<i>tsn1</i>
2	Московская 56	<i>tsn1</i>
3	Доминанта	<i>tsn1</i>
4	Московская 40	<i>tsn1</i>
5	Безенчукская 380	<i>tsn1</i>
6	Бирюза	<i>tsn1</i>
7	Инна	<i>tsn1</i>
8	Одесская 200	<i>tsn1</i>
9	Латыневка	<i>Tsn1</i>
10	Проза	***
11	Спартак	***
12	Дон 93	<i>Tsn1</i>
13	Льговская 167	<i>tsn1</i>

Продолжение табл. 11		
1	2	3
14	Престиж	<i>tsn1</i>
15	Синтетик	<i>Tsn1</i>
16	Антонивка	<i>tsn1</i>
17	Донской Сюрприз	<i>tsn1</i>
18	Лагуна	<i>Tsn1</i>
19	Льговская 4	<i>tsn1</i>
20	Скипетр	<i>tsn1</i>
21	Донера	<i>tsn1</i>
22	Косовица	<i>tsn1</i>
23	Мироновская 100	<i>tsn1</i>
24	Изюминка	<i>tsn1</i>
25	Круз	<i>tsn1</i>
26	Московская 39	<i>tsn1</i>
27	Звонница	<i>tsn1</i>
28	Мироновская 808	<i>tsn1</i>

Примечание *** – молекулярный анализ сорта дал неспецифическую реакцию.

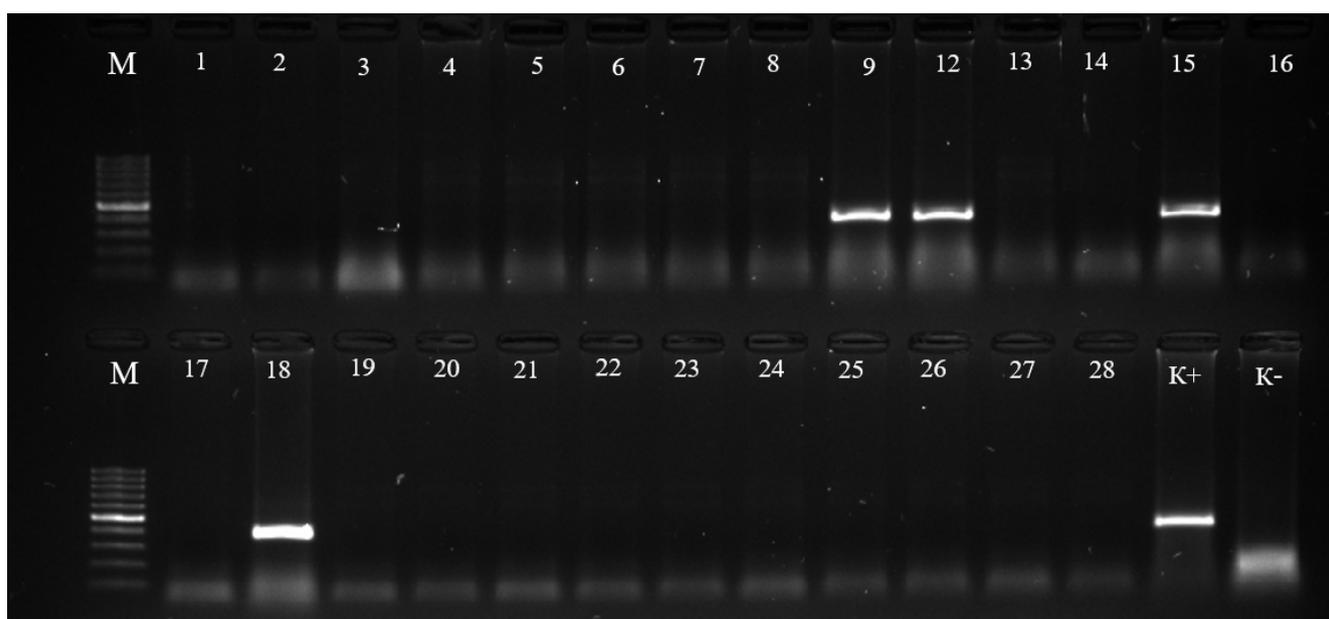


Рисунок 11. Электрофореграммы продуктов амплификации маркера Xfcp623 у сортов озимой мягкой пшеницы (Размер ампликона 380 пн). Номера, указанные для образцов, соответствуют списку сортов в таблице 8. (Положительный контроль – сорт Glenlea, отрицательный контроль – линия 6В365).

Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п.н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину *PtrToxA* у четырех образцов яровой пшеницы – Кинельская 6, Лебедушка, Тулайкоская 5 и Фаворит (33,3% от изученных) и контроля Glenlea, носителя гена *Tsn1* (таблица 12, рисунок 12).

Генотипы остальных 8 сортов яровой пшеницы несут рецессивную аллель гена *tsn1* (66,7% от изученных) (таблица 9, рисунок 12), что говорит об их невосприимчивости к токсину *PtrToxA*, обусловленной на генетическом уровне.

Таблица 12

Характеристика генотипов сортов яровой пшеницы по наличию гена

Tsn1/tsn1

№ п/п	Сорт	Наличие диагностического фрагмента маркера Xfcp623 (Tsn1/tsn1)
1	Белянка	<i>tsn1</i>
2	Безенчукская 182	<i>tsn1</i>
3	Воронежская 7	<i>tsn1</i>
4	Воронежская 14	<i>tsn1</i>
5	Жница	<i>tsn1</i>
6	Кинельская 6	<i>Tsn1</i>
7	Лебедушка	<i>Tsn1</i>
8	Мульти 6 R	<i>tsn1</i>
9	Тулайкоская 5	<i>Tsn1</i>
10	Фаворит	<i>Tsn1</i>
11	Удача	<i>tsn1</i>
12	Курская 2038	<i>tsn1</i>

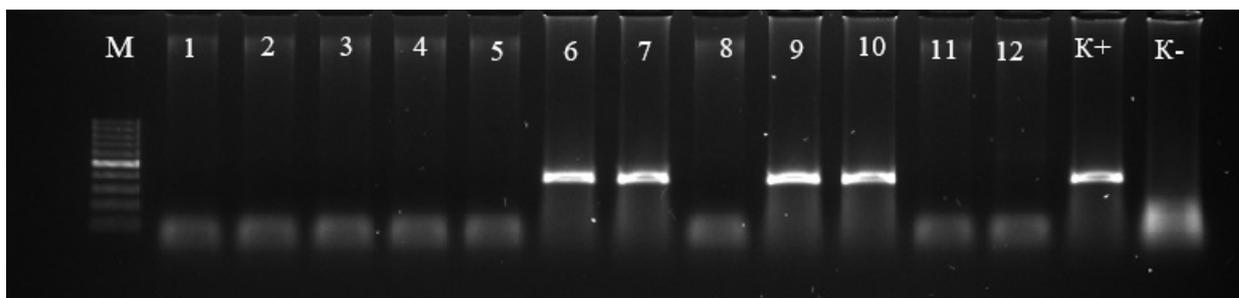


Рисунок 12. Электрофореграммы продуктов амплификации маркера Xfcr623 у сортов яровой пшеницы (Размер ампликона 380 пн). Номера, указанные для образцов, соответствуют списку сортов в таблице 2. (Положительный контроль – сорт Glenlea, отрицательный контроль - линия 6B365)

Ген *ToxA* имеет широкую представленность в генотипах российских популяций гриба *Pyrenophora tritici-repentis* [Мироненко и др., 2019] и мы можем отметить тот факт, что сорта пшеницы, допущенные к возделыванию, имеют защиту на генетическом уровне от *PtrToxA*. Данный токсин белкового происхождения характерен не только для *P. nodorum* и *P. avenae* f.sp. *triticea* – вызывающих септориоз листа и колоса, но и для *Pyrenophora tritici-repentis*, возбудителя пиренофороза. Таким образом, можно говорить о генетической защите районированных сортов от токсина *PtrToxA* трех опасных фитопатогенов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Септориозы - одни из наиболее распространенных болезней зерновых культур, способные в годы эпифитотий привести к прямым потерям урожая, превышающим 40 %.

При проведении экспериментальной части работы сочетали классические фитопатологические методы с современными методами молекулярной диагностики.

Всего в 2022 г. было собрано и проанализировано 87 инфекционных образцов озимой, яровой пшеницы, тритикале и овса с симптомами септориозов из 10 областей Европейской части России (Саратовская, Тамбовская, Воронежская, Пензенская, Белгородская и Липецкая области, Алтайского и Краснодарского края, Кабардино-Балкарской республики и Калмыкии). Что позволило выявить распространенные и редкие виды – возбудители болезни.

Болезнь вызывают несколько видов. В работе приводится современная систематика видов – возбудителей септориозов зерновых культур. Показано, что в изученных регионах самый распространенный видом – возбудителем септориозной пятнистости злаков был *Zymoseptoria tritici* – вызывающий септориоз листьев пшеницы, тритикале, ячменя, ржи кроме Алтайского края.

На территории России зафиксировано два вида рода *Parastagonospora*, включающие три формы, способные вызывать септориоз злаков: *Parastagonosporanodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous, *Parastagonospora avenae* (AB Frank) Quaedvl., Verkley & Crous f. sp. *triticea* (пшеничная форма), *Parastagonospora avenae* (AB Frank) Quaedvl., Verkley & Crous f. sp. *avenaria* (овсяная форма).

Вид *P. nodorum* – поражает лист, побег, колосовые чешуи, зерновку, ости, распространен на всех колосовых зерновых. Доминирует в фитопатогенном комплексе септориозных пятнистостей в Алтайском крае.

Вид *Septoria tritricicola* Lobik распространен на сортах пшеницы в Краснодарском крае, а также отмечается на территории Казахстана.

Септориоз вызывает грибом *Septoria secalis* Prill. & Delacr.

Многие фитопатогенные грибы обладают способностью выделять эффекторы, способствующие вирулентности фитофага. В 2022 г. было выделено и проанализировано 170 моноконидиальных изолятов, полученных с инфекционных образцов 17 сортов яровой пшеницы, высеянных на опытном поле Среднерусского филиала ФНЦ им. И.В. Мичурина (Тамбовская область). Ген *SnTox1* был выявлен среди изолятов, полученных с 6 сортов яровой пшеницы. Наличие гена отмечено у изолятов *P. nodorum* с сортообразцов Курская 2038 и Тулайковская 100. Наличие гена *SnTox1* отмечено у моноконидиальных изолятов *P. avenae* f. sp. triticea, выделенных с инфекционного материала сортов яровой пшеницы Краснокутка 10, Кинельская 6, Тулайковская 100 и Экада 109.

Наличие гена *SnTox3* выявлено среди изолятов вида *P. nodorum*, полученных из растительных образцов с сортов Курская 2038, Союз 1 и Воевода. Присутствие гена *SnTox3* отмечено у изолятов *P. avenae* f. sp. triticea, полученных с сортов Экада 109 и Воевода.

Ген *SnToxA* был выявлен среди изолятов *P. nodorum*, полученных с трех сортов яровой пшеницы: Союз 1, Пирамида и Воевода.

Встречаемость генов, кодирующих NEs в Тамбовской популяции вида *Parastagonospora nodorum* составила: *SnToxA* – 30%, *SnTox1* – 20%, *SnTox3* – 30%; в популяции вида *Parastagonospora avenae* f. sp. triticea: *SnToxA* – 0%, *SnTox1* – 57,1%, *SnTox3* – 30%.

Подобные исследования были проведены у изолятов вида *P. nodorum* алтайской популяции 2022 года. Установлено, что изоляты алтайской популяции вида *P. nodorum*, находящиеся в испытании не

содержали гены *ToxA* и *Tox1*. Все проанализированные изоляты содержали ген *Tox3*.

В изучение вирулентных свойств популяции были включены 8 моноконидиальных изолятов Алтайской популяции. Изоляты с *P. nodorum*, полученные с яровой (110-22-Р.н., 117-22-Р.н., 118-22-Р.н., 123-22-Р.н.) и озимой пшеницы (112-22-Р.н.) проявили себя как вирулентные при заражении большинства сортов пшеницы. Изолят, полученный с тритикале, (122-22-Р.н.) проявил вирулентность при заражении сортов яровой пшеницы и авирулентность при заражении сортов озимой пшеницы. Изоляты, полученные с овса (113-22-Р.н., 116-22-Р.н.) были патогенны для сортов пшеницы, но обладали авирулентностью.

Генотипирование образцов пшеницы с использованием молекулярного маркера было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсину *PtrToxA*. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п.н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину *PtrToxA* у четырех образцов озимой пшеницы – Латыневка, Дон 93, Синтетик и Лагуна (14,3% от изученных) и контроля Glenlea, носителя гена *Tsn1*. Генотипы остальных 24 сортов озимой пшеницы, находящихся в испытании, несут рецессивную аллель гена *tsn1* (85,7% от изученных)

Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п.н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину *PtrToxA* у четырех образцов яровой пшеницы – Кинельская 6, Лебедушка, Гуйлакоская 5 и Фаворит (33,3% от изученных) и контроля Glenlea, носителя гена *Tsn1*. Генотипы остальных 8 сортов яровой пшеницы несут рецессивную аллель гена *tsn1* (66,7% от изученных), что говорит об их невосприимчивости к токсину *PtrToxA*, обусловленной на генетическом уровне.

ВЫВОДЫ

1. Изучение видового состава возбудителей септориозов пшеницы, тритикале, ржи и овса из инфекционного материала 10 областей Европейской части России позволило установить, что за исключением Алтайского края, доминирующее положение в фитопатогенном комплексе септориозных пятнистостей занимал вид *Z. tritici*. В Алтайском крае - *P. nodorum*.

2. Изучены вирулентные свойства изолятов *P. nodorum* из алтайской популяции. Показано, что изоляты с яровой и озимой пшеницы проявили себя как вирулентные. Изолят, с тритикале проявил вирулентность при заражении сортов яровой пшеницы и авирулентность при заражении сортов озимой пшеницы. Изоляты, полученные с овса были патогенны для сортов пшеницы, но обладали авирулентностью.

3. При анализе 170 моноконидиальных изолятов *P. nodorum* и *P. avenaef. sp. triticea*, полученных с инфекционных образцов из Тамбовской области показано, что наличие гена *Tox1* отмечено у изолятов *P. nodorum* с сортообразцов Курская 2038 и Тулайковская 100. Наличие гена *Tox1* отмечено у моноконидиальных изолятов *P. avenaef. sp. triticea*, выделенных с инфекционного материала сортов яровой пшеницы Краснокутка 10, Кинельская 6, Тулайковская 100 и Экада 109.

Tox3 присутствовал в генотипе изолятов вида *P. nodorum*, с сортов Курская 2038, Союз 1 и Воевода; у изолятов *P. avenaef. sp. triticea*, полученных с сортов Экада 109 и Воевода.

Ген *SnToxA* был выявлен среди изолятов *P. nodorum*, полученных с трех сортов яровой пшеницы: Союз 1, Пирамида и Воевода.

Изоляты алтайской популяции вида *P. nodorum*, находящиеся в испытании не содержали гены *ToxA* и *Tox1*. Все проанализированные изоляты содержали ген *Tox3*.

4. С использованием ДНК-маркеров идентифицированы генетические детерминанты устойчивости к *SnToxA* у озимых сортов пшеницы: Липецкая звезда, Московская 56, Доминанта, Московская 40, Безенчукская 380, Бирюза, Инна, Одесская 200, Льговская 167, Престиж, Антонивка, Донской Сюрприз, Льговская 4, Скипетр, Донера, Косовица, Мироновская 100, Изюминка, Круиз, Московская 39, Звонница, Мироновская 808; а так же яровых: Беянка, Безенчукская 182, Воронежская 7, Воронежская 14, Жница, Мульти 6 R, Удача, Курская 2038. Молекулярный метод позволил установить, что перечисленные сорта имеют защиту на генетическом уровне от токсина *SnToxA* трех опасных фитопатогенов: *P. nodorum*, *P. avenae* f.sp. *triticea*, *P. tritici-repentis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агроном. Септориоз листьев пшеницы [Электронный ресурс]. URL: <https://www.youtube.com/watch?v=RLkTGtoPHko>(дата обращения: 26.01.2023)
2. Бакулина А.В., Харина А.В., Широких А.А. Септориоз листьев и колоса пшеницы: генетический контроль устойчивости хозяина (обзор). Теоретическая и прикладная экология. 2020; 2: 26-35. DOI 10.25750/1995-4301-2020-2-026-035
3. Бурда А.Г., Косников С.Н., Полусмак В.И., Бурда С.А. Автоматизация управления молочным стадом и оценка его экономической эффективности с использованием информационной системы. Серия конференций IOP: Наука о Земле и окружающей среде. 2021; 1: 624.
4. Захаренко В.А. Проблема резистентности вредных организмов к пестицидам – Мировая проблема. Вестник защиты растений. 2001; 1: 3-17.
5. Зеленева Ю.В. Обоснование генетической защиты пшеницы от вредоносных болезней в условиях Центрально-Черноземного региона. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений. СПб-Пушкин, 2019: 473.
6. Зеленева Ю.В., Аблова И.Б., Судникова В.П., Мохова Л.М., Конькова Э.А. Видовой состав возбудителей септориозов пшеницы в Европейской части России и идентификация генов-эффекторов SnToxA, SnTox1, SnTox3. Микология и фитопатология. 2022; 56 (6): 441–447. DOI 10.31857/S0026364822060113
7. Зеленева Ю.В., Аблова И.Б., Судникова В.П., Мохова Л.М., Конькова Э.А. Морфолого-культуральные свойства возбудителей септориозов зерновых культур из различных агроклиматических зон Российской Федерации. Российская сельскохозяйственная наука. 2022; 4: 27-32.

8. Зеленева Ю.В., Судникова В.П., Сидорова В.Д. Идентификация генов-эффекторов *SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3* в популяциях *Parastagonosporanodorum* и *Parastagonosporaavenaef.sp. triticea* Тамбовской области Российской Федерации. 2022: 346-353.
9. Информационное агентство Зерно Он-лайн: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.zol.ru/n/365ca> (дата обращения: 26.01.2023)
10. Коломиец Т.М. Пахолкова Е.В, Дубовая Л.П. Отбор исходного материала для создания сортов пшеницы с длительной устойчивостью к септориозу. М.: ПЕЧАТНЫЙ ГОРОД, 2017: 56.
11. Куликова Н.И., Патиева А.М., Черечеча А.А., Нимбона С. Новый способ повышения плодовитости коров. Журнал фармацевтических наук и исследований. 2018; 10: 1607-1609.
12. Мироненко Н.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophoratrifici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования *ToxA* и *ToxB*. Вестник защиты растений. 2019; 1(99): 24-29. DOI 10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29)
13. Моретти К., Лопес-Контрерас А., де Врие Т., Крафт А., Юнгингер М., Шен Л. От сельскохозяйственных (побочных) продуктов до авиатоплива: углеродный след и экономические показатели. Наука об общей окружающей среде. 2021; 775: 145848.
14. Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н. Частота встречаемости потенциально опасных рас в региональных популяциях *Zimoseptoria tritici* на посевах пшеницы // Аграрная наука. 2019; 1: 99-103. DOI 10.32634/0869-8155-2019-326-1-99-103
15. Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н., Куркова Н.А. Генетическая структура региональных популяций *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) – возбудителя септориоза пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Сельскохозяйственная биология. 2016; 51 (5): 722-730. DOI 10.15389/agrobiology.2016.5.722rus

16. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. Изд. 4, перераб. и доп. 1989: 480.
17. Пидопличко М.Н. Грибы - паразиты культурных растений. Определитель. Т. 3. Пикнидиальные грибы. Киев.: Наука думка, 1978: 232.
18. Плахотник В.В. Судникова В.П., Зеленева Ю.В., Кашковский А.А.. Развитие семенной инфекции на районированных сортах озимой пшеницы в Тамбовской области. Матеріали міжнародої науково-практичної Інтернет-конференції. Наука на службі сільського господарства. Том 2. Миколаїв, 2013: 35-37.
19. Пыжикова Г.В. Санин С.С., Санина А.А. и др. Диагностика, учет и защитные мероприятия против септориоза пшеницы (рекомендации). М.: ВО «Агропромиздат», 1988: 22.
20. Санин С.С. Фитосанитарная экспертиза зерновых культур (болезни растений). Рекомендации. М. ФГНУ «Росинформагротех». Колос. 2002: 138.
21. Санина А.А. Анциферова Л.В. Способы выделения и хранения возбудителей септориоза пшеницы. Микол. и фитопатю 1989; 23 (2): 172-175.
22. Санина А.А. Физиологическая специализация *Septoriatritici* Rob. et Desm. Микология и фитопатология. 1991; 25(4): 338–342.
23. Федеральная служба государственной статистики: Официальный сайт. [Электронный ресурс]. URL: <https://rosstat.gov.ru/> (датаобращения: 24.01.2023)
24. Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. Phytopathology. 2007; 97: 694–701. DOI 10.1094/PHYTO-97-6-0694
25. Babodoost M. Hebert T.T. Factors affecting infection of wheat seedling by *Septoria nodorum*. Phytopathology. 1984; 74 (5): 592-595.

26. Dodds P.N., Rathjen J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(8): 539-548. DOI 10.1038/nrg2812
27. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990; 12: 13–15.
28. Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U. A review of the interactions between wheat and wheat pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium spp.* and *Parastagonospora nodorum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 1138. [DOI 10.3390/ijms19041138](https://doi.org/10.3390/ijms19041138)
29. Eyal Z., Scharen A.L., Prescott J.M., Van Ginkel M. The septoria Diseases of Wheat. Concepts and Methods of Management. CIMMYT. 1987: 52.
30. Faris J.D., Friesen T.L. Plant genes hijacked by necrotrophic fungal pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 2020; 56: 74-80. DOI 10.1016/j.pbi.2020.04.003
31. Friesen T.L., Faris J.D. Characterization of Effector-Target Interactions in Necrotrophic Pathosystems Reveals Trends and Variation in Host Manipulation. *Annu Rev Phytopathol.* 2021; 59: 77-98. DOI10.1146/annurev-phyto-120320-012807
32. Gao Y., Faris J.D., Liu Z. et al. Identification and characterization of the SnTox6-*Snn6* interaction in the *Parastagonospora nodorum* – wheat pathosystem. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015; 28: 615–625. [DOI 10.1094/MPMI-12-14-0396-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0396-R)
33. <https://www.mycobank>[Электронный ресурс]. (дата обращения: 26.01.2023)
34. Jones J.D., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature.* 2006; 444(7117): 323-329. DOI 10.1038/nature05286
35. Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G. et al. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol.* 2015; 66:513-545. DOI 10.1146/annurev-arplant-043014-114623

36. Navathe S., Yadav P.S., Chand R. et al. *ToxA–Tsn1* interaction for spot blotch susceptibility in Indian wheat: an example of inverse gene-for-gene relationship. *Plant Dis.* 2020; 104 (1): 71-81. DOI 10.1094/ PDIS-05-19-1066-RE

37. Pakholkova E.V. , Kolomiets T.M., Salnikova N.N. et al. The main principles of formation of a collection of strains of the causative agents of septoriosiis of cereal crops. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021: 012001. DOI 10.1088/1755- 1315/663/1/012001

38. Richards J.K., Kariyawasam G.K., Seneviratne S. et al. A triple threat: the *Parastagonospora nodorumSnTox267* effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat. *New Phytol.* 2022; 233 (1): 427-442. DOI 10.1111/nph.17601

39. Shipton W.A. Boyd W.R.J., Rosielle A.A., Shearer B.I. The common septoria diseases of wheat. *Bot. Rev.* 1971; 37: 231-262.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Выделение ДНК из мицелия грибов и листьев пшеницы



Вибрационная мельница для криогенного измельчения



Конечный этап очистки ДНК этанолом и изопропанолом

Осаждение проб для последующей молекулярной диагностики

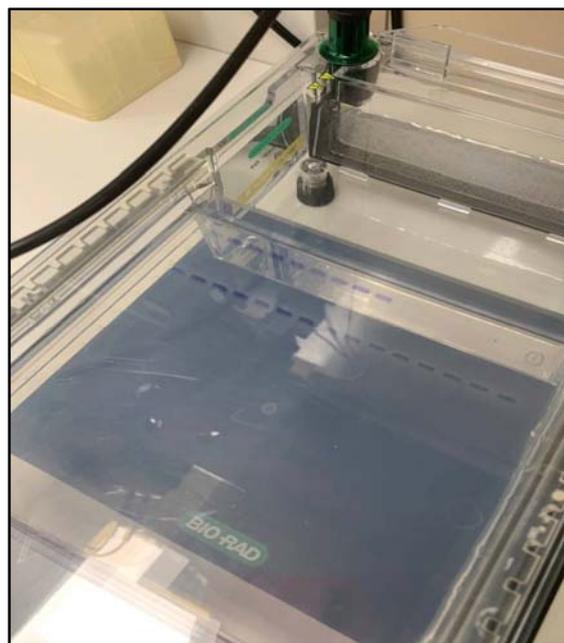
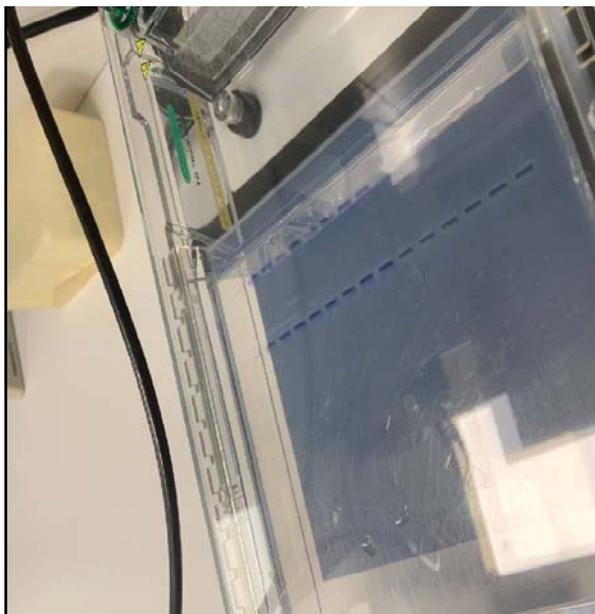


Центрифуга для пробирок



Мульти-Вортекс для перемешивания

Постановка электрофореза для детекции продуктов ампликации



Положение агарозного геля в камере



Электрофорезная вертикальная камера

**Изучение вирулентных свойств фитопатогенов на изолированных
листьях разных сортов пшеницы**



1 эксперимент



2 эксперимент



3 эксперимент



4 эксперимент