

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *HELMINTHOSPORIUM SOLANI* НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Сутьдина Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ломакин Артём Андреевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, дом 1: тел.: 89603621517

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Helminthosporium solani*, картофель, тест-система, полимеразно-цепная реакция, детекция, идентификация

В статье представлены результаты исследований по разработке тест-системы методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени для идентификации возбудителя серебристой парши - фитопатогенных грибов *Helminthosporium solani*. Применяя программное обеспечение Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0, для исследований был выбран ген бета-тубулин (*Helminthosporium solani* isolate HSCA1031). Тест-система для *Helminthosporium solani* включает специфические праймеры: прямой праймер (f) 5'-3' CCCTTGCCAGTTGTTACCG, обратный праймер (r) 3'-5' ACAGCTCTCCGTCGCCGAC. Протокол постановки реакции: предварительная денатурация - 95 °С - 5 минут (1 цикл); денатурация - 95 °С - 5 сек, отжиг - 60 °С - 15 сек (50 циклов). Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентный краситель - ROX, гаситель - BHQ-2. Чувствительность тест-системы составляет 1000 клеток. Установлена оптимальная концентрация праймеров, равная 8 pM каждого праймера на реакцию. Оптимальная концентрация зонда - 0,4 pM. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение дихотомических ключей не позволяет максимально точно дифференцировать фитопатогенные грибы *Helminthosporium solani*. Апробация на 16 полевых штаммах подтвердила принадлежность к вышеназванному виду с применением разработанной тест-системы только в отношении 12. Применение разработанной авторами ПЦР-диагностики в режиме реального времени сможет ускорить идентификацию возбудителя серебристой парши, вредоносность которой возрастает, когда в качестве вторичной инфекции выступают возбудители фитофтороза и фузариоза, фомоза и мягких бактериальных гнилей, и склероции которой на поверхности пятен на картофеле схожи с признаками антракноза (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes).

Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200367-8.

Введение

Helminthosporium solani, по литературным данным вызывает широко распространенное заболевание - паршу серебристую, к которой, в основном, чувствителен семенной картофель [1-3]. У контаминированных *Helminthosporium solani* клубней ослабляется иммунитет, возникает предрасположенность к развитию секундарной инфекции [4]. Возбудитель поражает перидерму клубней картофеля, вызывая появление пятен [5]. Цикл заболевания серебристым налетом имеет как полевые фазы, так и фазы хранения [6]. Первоначальное заражение происходит в поле, повышенная влажность ведет к распространению серебристой парши при хранении [7]. Борьба с

болезнью с помощью химических и культурных методов остается сложной задачей [8-9]. Увеличение заболеваемости связано с изолятами *Helminthosporium solani*, устойчивыми к последующему фунгициду тиабендазолу (TBZ) [10]. Исходя из вышеизложенного, цель настоящего исследования - разработка тест-системы для идентификации возбудителя серебристой парши - фитопатогенных грибов *Helminthosporium solani*, на основе ПЦР-РВ.

Материалы и методы исследований

В исследованиях было использовано 17 штаммов микроорганизмов рода *Helminthosporium spp.* в числе которых *Helminthosporium solani* VKM No. F-890 из VKM ФИЦ

«Пущинский научный центр биологических исследований» РАН, и 16 полевых штаммов рода *Helminthosporium spp.*, выделенных из проб картофеля с признаками порчи, и проб почвы, из которых 12 были представителями вида *Helminthosporium solani*. Определение специфичности подобранных праймеров проводили на штаммах *Fusarium oxysporum* VKM No. F-140, *Fusarium oxysporum* VKM No. F-143, *Aspergillus flavus* VKM No. F-25, *Aspergillus niger* VKM No. F-37, *Penicillium expansum* VKM No. F-275.

При идентификации выделенных авторов полевых штаммов грибов применяли методы культурально-морфологического исследования, дихотомические ключи В.И. Билай и Никитинского-Алеева [11]. Анализируемые пробы были доставлены в лабораторию из различных природно-географических зон РФ (Краснодарский и Ставропольский край, Ульяновская, Самарская, Воронежская, Ростовская, Белгородская, Курская, Орловская, Калининградская и Московская области).

Авторами был предложен метод «влажных камер» в полевых условиях и их транспортирование в пакетах из полимерного материала с застежкой-замком типа Zip-Lock (с размещением в сумках-термосах при температуре окружающей среды ниже +24 °С) с последующим их помещением в термостат (рабочая температура 25±1 °С) на 5-10 дней. Проводили микроскопические исследования по определению морфологических свойств фитопатогенных грибов, которые культивировали 5-10 суток на Сабуро (HiMedia, Индия) при температуре 25±1 °С. Выделение ДНК

из моноспорных культур *Helminthosporium spp.* осуществляли с использованием набора «Реал-Бест УниМаг» (ВекторБест, Россия).

Материалы: реакционная смесь БиоМа-стер HS-Taq ПЦР (2×), амплификатор детектирующий ДТпрайм (ДНК-технология, РФ), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с»-1 2 (ЛамСистем, РФ), центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии СМ-50М (ELMI, Польша), твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Польша), лабораторная посуда. Специфичные для *Helminthosporium solani* праймеры: прямой праймер (f) 5'-3' CCCTTTGCCAGTTGTTACCG, обратный праймер (r) 3'-5' ACAGCTCTCCGTCGCCGAC. Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентный краситель – ROX, гаситель - BHQ-2.

Множественное выравнивание гена бета-тубулина, кодирующего *Helminthosporium solani* isolate HSCA1031 осуществляли в ПО Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0. Подбор и дизайн праймеров был проведен в ПО NCBI BLAST-primer и UGENA 44.0. Подбор зонда - в UGENA 44.0 и Oligoevaluator ресурс (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>).

Результаты исследований

Для разработки тест-системы использовался ген бета-тубулина (*Helminthosporium solani* isolate HSCA1031). Бета-тубулин - мономерный глобулярный белок, участвующий в образовании микрофиламентов. По данным Rezaei-Matehkolaei A. et al. (2013) он успешно использовался для разграничения видов других групп грибов, таких как *Aspergillus*, *Penicillium*,

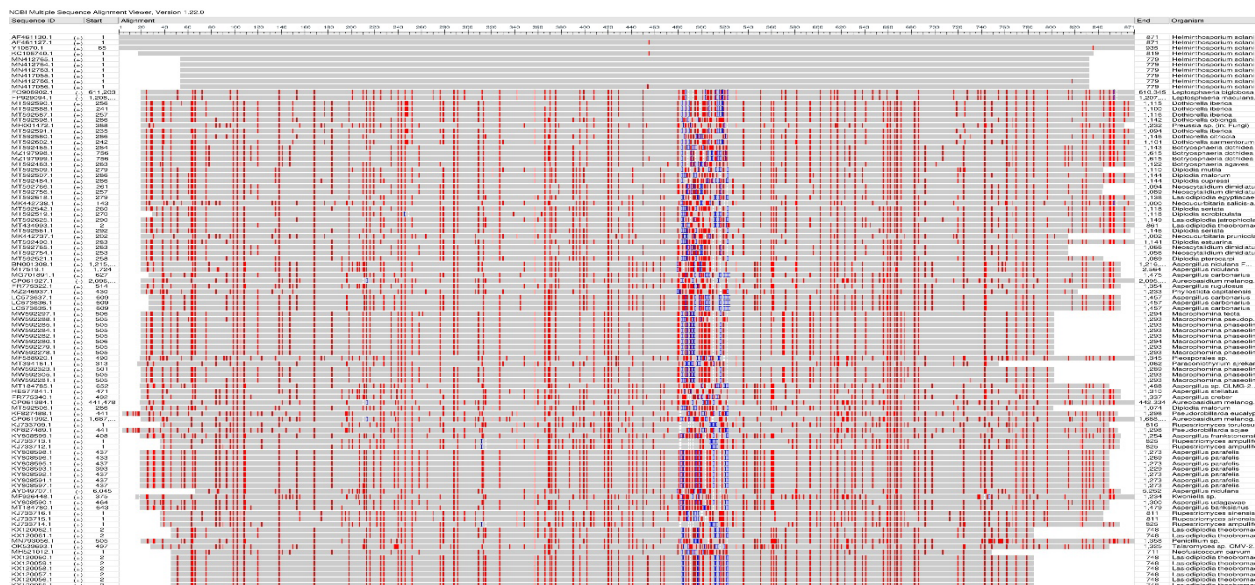


Рис. 1 – Фрагмент множественного выравнивания гена, кодирующего бета-тубулина *Helminthosporium solani* isolate HSCA1031 (Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1)

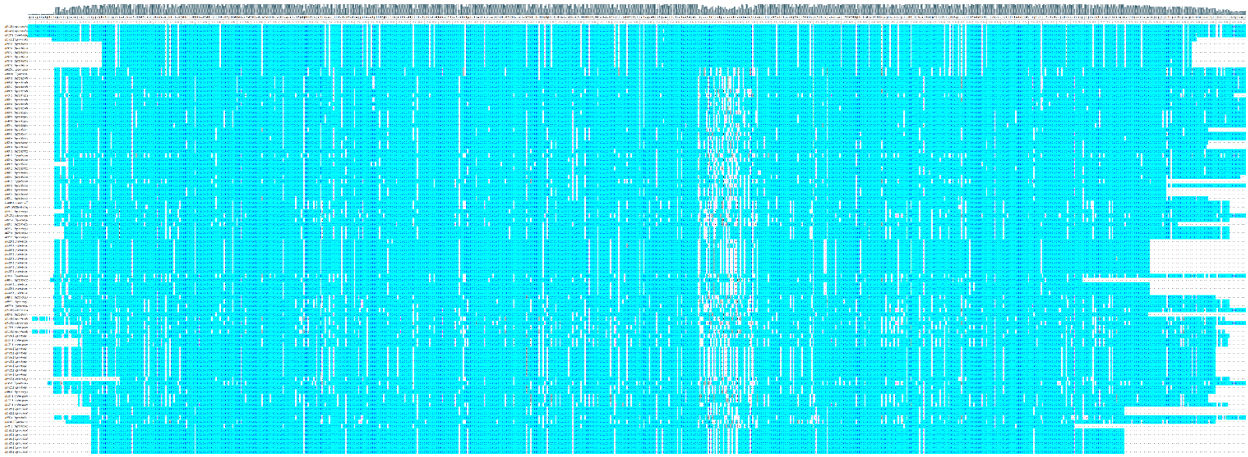


Рис. 2 – Фрагмент множественного выравнивания гена, кодирующего бета-тубулина *Helminthosporium solani* isolate HSCA1031 (UGENA 44.0)

Scedosporium и *Phaeoacremonium*. Локус включает несколько интронов, которые, как известно, являются хорошими оценщиками для различения близкородственных видов [7].

Было проведено множественное выравнивание гена, кодирующего бета-тубулина *Helminthosporium solani* isolate HSCA1031 в программах Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0 (рис. 1-2).

Основная информация о гене, кодирующем бета-тубулин *Helminthosporium solani* isolate HSCA1031, представлена на рисунке 3.

13.10.2022, 13:15 Helminthosporium solani isolate HSCA1031 beta-tubulin gene, partial cd - Nucleotide - NCBI

GenBank: AF461130.1

FASTA Genes Protein

LOCUS AF461130 871 bp DNA linear Pls 26-Jul-2004

DEFINITION Helminthosporium solani isolate HSCA1031 beta-tubulin gene, partial cds.

ACCESSION AF461130

VERSION AF461130.1

KEYWORDS

SOURCE

ORGANISM Helminthosporium solani (Fungi; Dikarya; Ascomycota; Perizomycotina; Dothideales; Pleosporales; Pleosporaceae; Helminthosporiaceae; Helminthosporium.)

REFERENCE 1 (bases 1 to 871) Cuhm, M.E. and Rizzo, D.M. Development of fungicide cross-resistance in *Helminthosporium solani* populations from California. *Journal of Applied Microbiology*.

REFERENCE 2 (bases 1 to 871) Cuhm, M.E. and Rizzo, D.M. Direct Submission Submitted (14-MAR-2004) Department of Plant Pathology, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA

FEATURES

source 1..871 /organism="Helminthosporium solani" /mol_type="genomic DNA" /isolate="HSCA1031" /host="potato" /db_xref="taxon:8328" /country="USA: California" /note="fungicide-resistant" ORF1 301..473,235..4871 /product="beta-tubulin" /cddon="cd07932..(871) /cddon_start=1 /product="beta tubulin" /protein_id="AB001880.1" /format="GenBank" /

ORIGIN

1 agcagatg gactctga gctctccc accactgg ttccctgac cctctctg

61 gattggac cagctcat gactctgc cagcagac cctcagaa actctctg

121 cagcagat tggctctg cactctgg cagcagac cctcagaa actctctg

181 actgagat cagcagat cagcagat ctgatttg tccagcag accagagat

241 tggattgc tccagcag cagcagat cctctctg ctgagcag cagcagac

301 atgactcc tcttactc cagcagat gacacttc cagcagat gactctac

361 tctctctg tggctctg cagcagat gacacttc cagcagat gactctac

421 tctctctg accctctg cagcagat gacacttc cagcagat gactctac

481 cagcagat tggctctg cagcagat gacacttc cagcagat gactctac

541 gactctac tcttactg accactcc cctcagca ctgagcag cctctctg

601 cagcagat agcactg actgctg gctctctg tccagcag cctctctg

661 gactctac tcttactg gactcttc cagcagat cctctctg gactctac

721 tctctctg tggctctg cagcagat gactcttc cctctctg gactctac

781 accagatg cagcagat accacttg ctgctctg cctctctg gactctac

841 tccctctg tggctctc cctctctg cctctctg gactctac

//

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/21306168

Рис. 3 - Основная информация о гене, кодирующем бета-тубулин *Helminthosporium solani* isolate HSCA1031 (GenBank)

На основании выбранной последовательности ДНК подобранного фрагмента был произведен подбор праймеров (применяли NCBI BLAST-primer и UGENA 44.0) и дизайн олигонуклеотидов, специфичность которых проверена (рис. 4).

13.10.2022, 13:10 Primer-Blast results

Input PCR template none

Specificity of primers Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Fungi)

Other reports Search Summary

ⓘ Detailed primer reports 4

You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers Submit

Ⓜ Help

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3'
Forward primer	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	61.76	57.14	3.00	2.00
Reverse primer	AGCATAGGCTGATGCTGTAGGC	23	64.59	56.52	9.00	2.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>AF461130.1 Helminthosporium solani isolate HSCA1031 beta-tubulin gene, partial cds

	product length	Forward primer	Reverse primer	Template
1	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
2	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
3	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
4	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23

>AF461127.1 Helminthosporium solani isolate HSCA1021 beta-tubulin gene, partial cds

	product length	Forward primer	Reverse primer	Template
1	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
2	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
3	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
4	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23

>Y10670.1 H.solanii gene encoding beta-tubulin

	product length	Forward primer	Reverse primer	Template
1	173	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	23
2	237	CCCTTGCCCAGTTGTTACCG	21	237

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/primer-blast/primerblast.cgi?seq_page=166551962&pr_..._key=ty+Hs02EduyY0q0p0e05c-ent+y4K03u4C-Check... 3/5

Рис. 4 - Проверка специфичности подобранных праймеров, специфичных для *Helminthosporium solani* (NCBI BLAST-primer)

После серии экспериментов с синтезированными праймерами на эталонном штамме авторами был отработан и оптимизирован протокол для проведения ПЦР в режиме реального времени с применением интеркалирующего красителя SYBR Green. Анализировали экстрагированную ДНК *Helminthosporium solani* VKM No. F-890 в качестве матрицы при следующих показателях цикла ПЦР:

- предварительная денатурация-95°C - 5 минут [1 цикл];

- денатурация- 95°C - 5 сек,
- отжиг- 60 °С - 15 сек [30 циклов].

Был произведен подбор оптимальной концентрации праймеров и изучена видоспецифичность (рис. 5-6). Изучаемые концентрации праймеров: 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM каждого праймера на реакцию Эмпирически было установлено, что увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции, поэтому в наших дальнейших исследованиях была использована концентрация 8 pM каждого праймера на реакцию.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Результат
A1	7pM (60-40 2)	13,5	+
A2	8pM (60-40 2)	13,3	+
A4	9pM (60-40 2)	14,4	+
A5	10 pM (60-40 2)	14,5	+
B1	К- (60-40)		-
B2	К- (60-40)		-
B4	К- (60-40)		-
B5	К- (60-40)		-

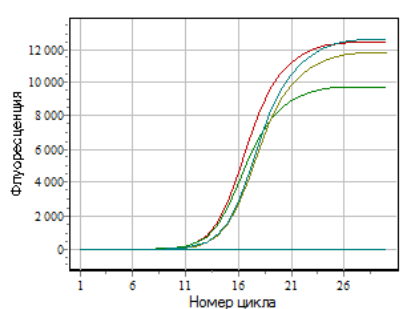


Рис. 5 - Подбор оптимальной концентрации разработанных праймеров постановки ПЦР-РВ для идентификации *Helminthosporium solani* с использованием интеркалирующего красителя SYBR GREEN

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Результат
A1	<i>Helminthosporium solani</i> . F-890	15,8	+
A5	<i>Aspergillus flavus</i> F-25		-
A6	<i>Penicillium expansum</i> . F-25		-
A7	<i>Fusarium oxysporum</i> . F-143		-
A8	<i>Fusarium oxysporum</i> . F-140		-
A9	<i>Aspergillus niger</i> No. F-37		-
H9	К- (60-40) <i>Penicillium expansum</i> . F-25		-

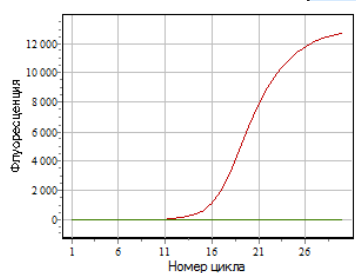


Рис. 6 - Изучение специфичности разработанных праймеров для идентификации *Helminthosporium solani*

Произведён подбор зонда для определения чувствительности разработанной системы (NSBI BLAST-primer и UGENA 44.0.) - GCTATTGCGGCTTTGCTGC, в качестве флуоресцентного красителя был использован ROX, гасителя - BHQ-2. Подобрана его оптимальная концентрация - 0,4 pM. Оптимальные показатели цикла для проведения ПЦР-РВ с флуоресцентным красителем:

- предварительная денатурация-95°C - 5 минут [1 цикл];
- денатурация- 95°C - 5 сек;
- отжиг- 60 °С - 15 сек [50 циклов].

Определено, что чувствительность разработанной системы составила 10³ геномов (рис. 7).

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Rox	Результат
H1	1 разведение (60-40)	24,4	+
A9	2 разведение (60-40)	28,6	+
B2	3 разведение (60-40)	33,0	+
A10	4 разведение (60-40)	36,2	+
H3	5 разведение (60-40)		-
H4	6 разведение (60-40)		-
H5	К- (60-40)		-

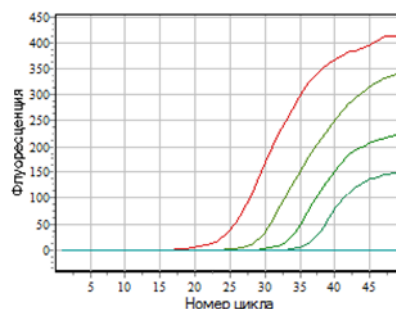


Рис. 7 - Результаты определения чувствительности подобранного протокола для детекции *Helminthosporium solani* методом ПЦР-РВ с дедукцией по каналу ROX

Апробация разработанной системы для идентификации *Helminthosporium solani* методом ПЦР-РВ проводилась на 16 полевых штаммах рода *Helminthosporium spp.*, которые первоначально были идентифицированы на основании изучения культурально-морфологических характеристик (рис. 8).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение дихотомических ключей не позволяет максимально точно дифференцировать фитопатогенные грибы *Helminthosporium solani*, из 16 полевых штаммов, только в отношении 12 была подтверждена принадлежность к вышеназванному виду.

Номер лунки	Идентификатор проби	Ср, Rox	Результат
A1	Helminthosporium spp. 78		-
F1	Helminthosporium spp. 80	35,3	+
B2	Helminthosporium spp. 82	33,1	+
D2	Helminthosporium spp. 84	29,9	+
D4	Helminthosporium spp. 85	29,6	+
G4	Helminthosporium spp. 89	30,7	+
A6	Helminthosporium spp. 93		-
B6	Helminthosporium spp. 94	30,1	+
D7	Helminthosporium spp. 97	28,5	+
C8	Helminthosporium spp. 99	26,6	+
D8	Helminthosporium spp. 102		-
F8	Helminthosporium spp. 103	40,3	+
D9	Helminthosporium spp. 106	32,1	+
G9	Helminthosporium spp. 108	29,4	+
A12	Helminthosporium spp. 112	29,1	+
E12	Helminthosporium spp. 116		-
C8	K+	28,4	+
G12	K-		-

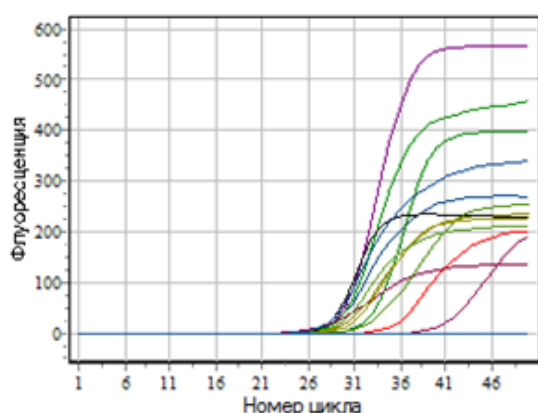


Рис. 8 - Результаты апробации разработанной ПЦР-РВ для идентификации *Helminthosporium solani*

Обсуждение

Последовательности гена бета-тубулина были зарегистрированы у 12 штаммов *Helminthosporium solani*, выделенных из клубней картофеля и проб почвы, полученных в разных регионах РФ.

Разработанная авторами тест-система не имеет аналогов и подходит для анализа объектов растениеводства и проб почвы. Экспериментально было установлено, что из 24 проб семенного картофеля, произведенного в разных регионах РФ, 3 содержат ДНК *Helminthosporium solani*. Товарный картофель, исследованный авторами, в количестве 22 проб в 8 случаях был заражен *Helminthosporium solani*. Из 8 проб почвы 1 была контаминирована *Helminthosporium solani*.

По мнению Д.Н. Говорова с соавт. (2010), одной из причин низкой урожайности картофеля в Российской Федерации является его контаминация возбудителями бактериозов и микозов, в том числе серебристой паршой [12]. Роль фитопатоген-

на *Helminthosporium solani* в развитии болезней картофеля заключается в том, что его вредоносность возрастает, когда в качестве вторичной инфекции выступают возбудители фитофтороза и фузариоза, фомоза и мягких бактериальных гнилей [13]. Применение разработанной авторами ПЦР-диагностики сможет существенно облегчить проведение данных исследований. Известно, что признаки серебристой парши, в частности склероции на поверхности пятен, схожи с признаками антракноза (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes) [14]. При диагностике серебристой парши возникают определенные сложности: поверхность пятен на клубнях остается ровной, но края приобретают вогнутость вследствие потери тургора. По мнению А.В. Хютти с соавт. (2021), такое проявление выявляется очень редко и, как правило, оно является следствием нарушения режима хранения картофеля [15]. Но именно эту форму серебристой парши учитывают в ГОСТ 33996-2016, и данный подход к регистрации микоза ведет к более широкому его распространению, потому что не фиксируются иные формы данного микоза, и контаминированные партии допускают к посадке [16].

Заключение

Коллективом авторов была разработана оригинальная тест-система для идентификации фитопатогенных грибов *Helminthosporium solani* методом ПЦР-РВ на основании детекции специфического участка генома, кодирующего производство бета-тубулина. Тест-система для *Helminthosporium solani* включает специфические праймеры: прямой праймер (f) 5'-3' CCCTTGCCAGTTGTTACCG, обратный праймер (r) 3'-5' ACAGCTTCCGTCCCGAC. Протокол постановки реакции: предварительная денатурация – 95 °С - 5 минут (1 цикл); денатурация - 95 °С - 5 сек, отжиг - 60 °С - 15 сек (50 циклов). Зонд: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, флуоресцентный краситель – ROX, гаситель - BHQ-2. Чувствительность тест-системы составляет 1000 клеток. Установлена оптимальная концентрация праймеров, равная 8 рМ каждого праймера на реакцию. Оптимальная концентрация зонда - 0,4 рМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение дихотомических ключей не позволяет максимально точно дифференцировать фитопатогенные грибы *Helminthosporium solani*, из 16 полевых штаммов только в отношении 12 была подтверждена принадлежность к выше-названному виду с применением разработанной тест-системы.

Библиографический список

1. Errampalli, D. Emergence of silver scurf (*Helminthosporium solani*) as an economically important disease of potato / D. Errampalli, J. M. Saunders, J. Holley // Plant pathology. – 2001. – Т. 50, № 2. – P. 141-153.
2. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers / D. W. Cullen, A. K. Lees, I. K. Toth, J. M. Duncan // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – Т. 107, № 4. – P. 387-398.
3. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens / Y. Daguerre, K. Siegel, V. Edel-Hermann, C. Steinberg // Fungal Biology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 28. – P. 97-125.
4. Firman, D. M. Transmission of *Helminthosporium solani* from potato seed tubers and effects of soil conditions, seed inoculum and seed physiology on silver scurf disease / D. M. Firman, E. J. Allen // The Journal of Agricultural Science. – 1995. – Vol. 124. – P. 219-234.
5. Pre- and postharvest measures used to control decay and mycotoxigenic fungi in potato (*Solanum tuberosum* L.) during storage / J. Liu, Z. Sun, Y. Zou, W. Li, F. He, X. Huang, C. Lin, Q. Cai, M. Wisniewski, X. Wu // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2022. – Vol. 62(2). – P. 415-428.
6. Lysøe, E. A Three-Way Transcriptomic Interaction Study of a Biocontrol Agent (*Clonostachys rosea*), a Fungal Pathogen (*Helminthosporium solani*), and a Potato Host (*Solanum tuberosum*) / E. Lysøe, M. W. Dees, M. B. Brurberg // Molecular plant-microbe interactions. – 2017. – Vol. 30(8). – P. 646-655.
7. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes / A. Rezaei-Matehkolaei, H. Mirhendi, K. Makimura, G. S. de Hoog, K. Satoh, M. J. Najafzadeh, M. R. Shidfar // Medical mycology. – 2014. – Т. 52, № 7. – P. 674-688.
8. Alternatively spliced, spliceosomal twin introns in *Helminthosporium solani* / N. Ág, M. Flipphi, L. Karaffa, C. Scazzocchio, E. Fekete // Fungal Genetics and Biology. – 2015. – Vol. 85. – P. 7-13.
9. Diversity of microfungi in sandy beach soil of teluk aling, pulau pinang / L. Zakaria, T. L. Yee, M. Zakaria, B. Salleh // Tropical Life Sciences Research. – 2011. – Vol. 22(1). – P. 71-80.
10. Cunha, M. G. Occurrence and epidemiological aspects of potato silver scurf in California / M. G. Cunha, D. M. Rizzo // Horticultura Brasileira. – 2004. – Vol. 22. – P. 690-695.
11. Билай, В. И. Основы общей микологии / В. И. Билай. – Киев : Вища школа, 1980. – 360с.
12. Говоров, Д. Н. Серебристая парша - опасное заболевание клубней картофеля / Д. Н. Говоров, А. В. Живых, А. Ю. Мирский // Защита и карантин растений. - 2010. - № 9. – С. 42-43. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/serebristaya-parsha-opasnoe-zabolevanie-klubney-kartofelya> (дата обращения: 15.12.2022).
13. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato / R. Corcuff, J. Mercier, R. Tweddell, J. Arul // Fungal Biology. – 2011. – Vol. 115 (3). - P. 220-227.
14. Isolation and Characterization of an Endophytic Fungus *Colletotrichum coccodes* Producing Tyrosol From *Houttuynia cordata* Thunb. Using ITS2 RNA Secondary Structure and Molecular Docking Study / R. Talukdar, S. Padhi, A. K. Rai, M. Masi, A. Evidente, D. K. Jha, A. Cimmino, K. Tayung // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Vol. 17(9). – P. 650247.
15. Хютти, А. В. Серебристая парша картофеля / А. В. Хютти, А. М. Лазарев, В. К. Чеботарь // Сельскохозяйственные вести. - 2021. - № 1 (124). - С. 56–57.
16. Техэксперт. ГОСТ 33996-2016 Межгосударственный стандарт. Картофель семенной Технические условия и методы определения качества Seed potatoes. Specifications and methods of determining the quality. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200143601?ysclid=lciv0e725q435699062> (дата обращения 11.02.2022).

THEORETICAL ASPECTS OF DEVELOPMENT AND APPROBATION OF A TEST SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF *HELMINTHOSPORIUM SOLANI* ON THE BASIS OF POLYMERASE CHAIN REACTION

Feoktistova N.A., Mastilenko A.V., Suldina E.V., Lomakin A.A.
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1: tel.: 89603621517
e-mail: feokna@yandex.ru

Keywords: *Helminthosporium solani*, potato, test system, polymerase chain reaction, detection, identification

The article presents results of the research on development of a test system by means of polymerase chain reaction with real-time detection for identification of the causative agent of silver scab - *Helminthosporium solani* phytopathogenic fungi. Applying Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 and

UGENA 44.0 software, beta-tubulin gene (*Helminthosporium solani* isolate HSCA1031) was selected for the research. The test system for *Helminthosporium solani* includes specific primers: forward primer (f) 5'-3' CCCTTTGCCAGTTGTTACCG, reverse primer (r) 3'-5' ACAGCTCTCCGTCGCCGAC. Reaction protocol includes preliminary denaturation - 95 °C - 5 minutes (1 cycle); denaturation - 95 °C - 5 sec, annealing - 60 °C - 15 sec (50 cycles). As far as probe is concerned: AGCATAGGCTGATGCTCGTAGGC, fluorescent dye - ROX, quencher - BHQ-2. The sensitivity of the test system is 1000 cells. Appropriate concentration of primers was set equal to 8 pM of each primer per reaction. Appropriate probe concentration is 0.4 pM. The obtained results indicate that usage of dichotomous keys does not allow more accurate differentiation of *Helminthosporium solani* phytopathogenic fungi. Approbation on 16 field strains confirmed appurtenance to the above species using the developed test system only in relation to 12. Application of real-time PCR diagnostics developed by the authors can accelerate identification of the causative agent of silver scab, the harmfulness of which increases when pathogens of late blight and fusarium, phomosis and soft bacterial rots act as a secondary infection, sclerotia of which are similar to signs of anthracnose (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes) on the surface of spots on potatoes.

Bibliography:

1. Errampalli, D. Emergence of silver scurf (*Helminthosporium solani*) as an economically important disease of potato / D. Errampalli, J. M. Saunders, J. Holley // *Plant pathology*. - 2001. - V. 50, №2. - P. 141-153.
2. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers / D. W. Cullen, A. K. Lees, I. K. Toth, J. M. Duncan // *European Journal of Plant Pathology*. - 2001. - V. 107, №4. - P. 387-398.
3. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens / Y. Daguerre, K. Siegel, V. Edel-Hermann, C. Steinberg // *Fungal Biology and Biotechnology*. - 2014. - Vol. 28. - P. 97-125.
4. Firman, D. M. Transmission of *Helminthosporium solani* from potato seed tubers and effects of soil conditions, seed inoculum and seed physiology on silver scurf disease / D. M. Firman, E. J. Allen // *The Journal of Agricultural Science*. - 1995. - Vol. 124. - P. 219-234.
5. Pre- and postharvest measures used to control decay and mycotoxigenic fungi in potato (*Solanum tuberosum* L.) during storage / J. Liu, Z. Sun, Y. Zou, W. Li, F. He, X. Huang, C. Lin, Q. Cai, M. Wisniewski, X. Wu // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. - 2022. - Vol. 62(2). - P. 415-428.
6. Lysøe, E. A Three-Way Transcriptomic Interaction Study of a Biocontrol Agent (*Clonostachys rosea*), a Fungal Pathogen (*Helminthosporium solani*), and a Potato Host (*Solanum tuberosum*) / E. Lysøe, M. W. Dees, M. B. Brurberg // *Molecular plant-microbe interactions*. - 2017. - Vol. 30(8). - P. 646-655.
7. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes / A. Rezaei-Matehkolaei, H. Mirhendi, K. Makimura, G. S. de Hoog, K. Sato, M. J. Najafzadeh, M. R. Shidfar // *Medical mycology*. - 2014. - V. 52, №7. - P. 674-688.
8. Alternatively spliced, spliceosomal twin introns in *Helminthosporium solani* / N. Ág, M. Flippi, L. Karaffa, C. Scazzocchio, E. Fekete // *Fungal Genetics and Biology*. - 2015. - Vol. 85. - P. 7-13.
9. Diversity of microfungi in sandy beach soil of teluk aling, pulau pinang. / L. Zakaria, T. L. Yee, M. Zakaria, B. Salleh // *Tropical Life Sciences Research*. - 2011. - Vol. 22(1). - P. 71-80.
10. Cunha, M. G. Occurrence and epidemiological aspects of potato silver scurf in California / M. G. Cunha, D. M. Rizzo // *Horticultura Brasileira*. - 2004. - Vol. 22. - P. 690-695.
11. Bilay, V. I. Basics of general mycology / V. I. Bilay. - Kiev: Higher School, 1980. - 360p.
12. Govorov, D.N. Silver scab is a dangerous disease of potato tubers / D.N. Govorov, A.V. Zhivikh, A.Yu. Mirskiy // *Plant Protection and Quarantine*. - 2010. - №9. - P. 42-43. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/serebristaya-parsha-opasnoe-zabolevanie-klubney-kartofelya> (access date: 15.12.2022).
13. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato / R. Corcuuff, J. Mercier, R. Tweddell, J. Arul // *Fungal Biology*. - 2011. - Vol. 115(3). - P. 220-227.
14. Isolation and Characterization of an Endophytic Fungus *Colletotrichum coccodes* Producing Tyrosol From *Houttuynia cordata* Thunb. Using ITS2 RNA Secondary Structure and Molecular Docking Study / R. Talukdar, S. Padhi, A. K. Rai, M. Masi, A. Evidente, D. K. Jha, A. Cimmino, K. Tayung // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. - 2021. - Vol. 17(9). - P. 650247.
15. Khyutti, A. V. Silvery Scab of Potatoes / A. V. Hyutti, A. M. Lazarev, V. K. Chebotar // *Agricultural News*. - 2021. - №1(124). - P. 56-57.
16. Technical expert. State Standard GOST 33996-2016 Interstate standard. Seed potatoes Specifications and methods for specification of the quality of Seed potatoes. Specifications and methods of specification of the quality. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200143601?ysclid=lciv0e725q435699062> (access date: 11.02.2022.)