

ФІТОПАТОЛОГІЯ

УДК 57.08:632.08

Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., ст. наук. співроб., гол. наук. співроб.,
А. Є. СОЛОДЕНКО, к. б. н., ст. наук. співроб., пров. наук. співроб.,
І. А. БАЛАШОВА, к. б. н., пров. наук. співроб.,
О. О. ЗАХАРОВА, к. б. н.,
А. М. ВЕНГЕР, мол. наук. співроб.
СГІ–НЦНС, Одеса
e-mail: natavolki@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНА ДЕТЕКЦІЯ ЗБУДНИКІВ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

Для детекції патогенних організмів у тканинах сільськогосподарських рослин (пшениці м'якої, кукурудзи, соняшнику, хмелю звичайного) опрацьовано молекулярні маркери на основі методу полімеразної ланцюгової реакції.

Ключові слова: молекулярні маркери, фітопатогени, сільськогосподарські культури, полімеразна ланцюгова реакція.

Вступ. Втрати врожаю сільськогосподарських культур від шкідників, хвороб та бур'янів в Україні щороку сягають 12–18 %, а за масового розмноження збудників — 25–50 %. Традиційні методи діагностики збудників інфекцій у рослин — використання рослин-індикаторів для ідентифікації вірусів, спеціальних середовищ для виявлення бактерій *etc* — досить трудомісткі і займають багато часу (дні, в ряді випадків, тижні і місяці).

Актуальною є необхідність при аналізі рослинного матеріалу застосування високочутливих і специфічних методів детекції, що дозволяють визначити навіть незначну кількість патогенів. Це особливо важливо при контролі рослинного матеріалу на наявність карантинних патогенів. Тому в практику контролю фітосанітарного стану сільськогосподарських рослин і продуктів їх переробки (додатково чи на зміну традиційним та серологічним методам) необхідно впроваджувати молекулярні технології, зокрема на основі методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР-метод дозволяє виявити збудників інфекційних захворювань за наявністю у пробі їхнього генетичного матеріалу навіть у тих випадках, коли іншими методами (зокрема візуальною діагностикою хвороби за симптомами та мікроскопією) зробити це технічно неможливо.

Мета наших досліджень: визначити ДНК-маркери для детекції збудників інфекційних хвороб сільськогосподарських культур, а саме грибів

Plasmopara helianthi в тканинах рослин соняшнику, грибів роду *Fusarium* у зерні кукурудзи та пшениці, роду *Alternaria* у зерні кукурудзи, бактерії *Agrobacterium tumefaciens* в тканинах рослин хмелю звичайного.

Матеріал і методи. Матеріалом слугували: інбредні лінії соняшнику 102 А и ОС 1029 А; лінії-диференціатори стійкості соняшнику до певних рас *Plasmopara halstedii* RHA-265, RHA-419, 803-I; зразки дикорослого соняшнику *Helianthus argophyllus*; сорт пшениці м'якої Одеська напівкарликова; інбредні лінії кукурудзи ГК26, ДС10/3, ОК124, ДК277-10, W275, П343, ВІР27, ОК39, ОК104-4, БК440; сорти хмелю звичайного Альта та Клон 18; культура грибів роду *Fusarium* — штами *F. macroceras*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*; культура грибів роду *Alternaria* — *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. brassicae*, культура грибів *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, культура агробактерії *Agrobacterium tumefaciens*.

Екстракція ДНК з рослинних тканин, постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез в агарозних і поліакриламідних гелях здійснювали за загальноприйнятими методиками.

Результати.

ДНК-маркер для детекції збудника несправжньої борошнистої роси соняшнику. Збудник несправжньої борошнистої роси (НБР) соняшнику — *Plasmopara halstedii* Farl. — облигатний патоген грибної природи з класу *Oomycetes*. Значне збільшення площ під соняшником, передчасне його повернення на попередні місця вирощування спричиняє накопичення інфекції у ґрунті. Ооспори несправжньої борошнистої роси зберігаються в насінні уражених рослин, у ґрунті, в уражених сходах падалиці. Шкодочинність цього захворювання зумовлює обов'язкове лабораторне тестування стійкості селекційного матеріалу. Лабораторна оцінка стійкості великої кількості селекційних зразків здійснюється експрес-методом щорічно у зимовий період. Для одержання належних результатів необхідно дотримуватись певних умов проведення дослідження: визначений розмір проростків та сформованість сім'ядольних листків на етапі штучного зараження, оптимальне інфекційне навантаження, тобто концентрація зооспорангіїв гриба в інокулюмі, тривалість періоду інокуляції та температурний режим. У масових оцінках можливе певне недотримання методики з об'єктивних причин. До того ж, у процесі імунологічного аналізу частина проростків гине від супутніх інфекцій. Молекулярна діагностика патогена може сприяти отриманню об'єктивної оцінки стійкості рослин соняшнику. Аналіз послідовності генів 28 S-РНК (з бази даних GenBank) у дев'яти ізолятів *Plasmopara halstedii* і 60 ізолятів інших видів ооміцетів дозволив виявити дві поліморфні ділянки гена, одна з яких специфічна тільки для *P. halstedii* [1].

З метою довести можливість використання ДНК-маркера для виявлення збудника несправжньої борошнистої роси в тканинах рослин соняшнику на різних стадіях розвитку провели молекулярно-генетичне

дослідження методом ампліфікації специфічної послідовності геному *P. halstedii* [2].

Матеріалом дослідження слугувало насіння та рослини соняшнику інбредних ліній 102А и ОС1029А селекції СГІ–НЦНС; ліній-диференціаторів стійкості до певних рас несправжньої борошнистої роси: RHA-265, RHA-419, 803-I; зразків дикорослого виду *Helianthus argophyllus*, які тестували в лабораторних умовах [3], на стадії оцінки стійкості; рослини на стадії цвітіння. Для проведення молекулярно-генетичного дослідження виділяли ДНК з фрагментів проростків, паренхімних та судинних тканин листя, зі спорангіїв, що були вилучені з уражених несправжньою борошнистою россою зразків, та використовували праймери, запропоновані для аналізу послідовності рДНК геному *Plasmopara* [1], а також праймери, які фланкують мікросателітний локус геному соняшнику *ORS1039*.

За результатом ПЛР з праймерами до послідовності рДНК *P. halstedii* ампліфіковано фрагмент ДНК розміром 308 п. н. у тих випадках, коли матричною була ДНК, виділена з уражених грибом проростків та зі спорангіїв (рис. 1).

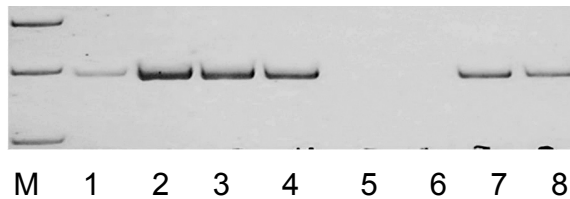


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК, виділеної з уражених проростків (1–4), зразків соняшнику без візуальних ознак ураження (5, 6), зі спорангіїв (7, 8). М — маркер молекулярної маси ДНК рUC19/ Msp I

Застосований метод виділення ДНК дозволяє отримати препарати сумарної ДНК рослини соняшнику і гриба, тому нами додатково оцінено специфічність молекулярно-генетичного маркера, а також можливість появи «помилково-позитивних» та «помилково-негативних» результатів ампліфікації. Сумарну ДНК з проростків виділяли на заключній стадії імунологічної оцінки стійкості. Ліній-диференціатори RHA419 і 803-I (носії генів PI_{ARG} і $PI8$, які надають стійкість практично усім патотипам *P. halstedii*) за результатами імунологічного тестування не вражалися несправжньою борошнистою россою. Неможливість розвитку патогена в тканинах ліній RHA419 і 803-I підтверджується відсутністю ампліфікації маркерного фрагмента ДНК розміром 308 п. н. Ті ж препарати виділеної ДНК дозволяють отримати для ліній RHA419 і 803-I фрагмент ампліфікації мікросателітного локусу геному соняшнику *ORS1039* розміром 200 п. н. Сумарна ДНК, виділена з ураженого россою проростка — зразка лінії 102А, дозволяє виявити фрагмент, специфічний для геному *P. halstedii*, і фрагмент, характерний для геному соняшнику.

Для молекулярно-генетичної детекції патогенного гриба *P. halstedii* в тканинах рослин соняшнику, які вирощували в польових умовах, досліджували зразки, які виявляли ознаки ураження грибними патогенами. Для зразків з характерними симптомами несправжньої борошністої роси (низькорослість, хлороз і гофрованість листових пластинок, зав'янення кошиків) показано наявність у судинних тканинах листа і стебла ДНК *P. halstedii*. При використанні ДНК, виділеної з паренхімних тканин тих же зразків, ДНК-маркер не виявлено, що пояснюється особливостями розвитку і локалізації патогена в рослині.

ДНК-детекція грибів роду *Fusarium* і роду *Alternaria* в насінні кукурудзи та продуктах його переробки. Інфікування кукурудзи грибами є причиною значних економічних втрат у результаті зниження врожайності, гігієнічної небезпеки для людини та сільськогосподарських тварин внаслідок виділення мікотоксинів і зменшення технологічної якості зерна. Складність захисту людини від мікотоксикозів посилюється тим, що продукти рослинного походження (зерно і зернопродукти), що містять мікотоксигенні гриби, не втрачають своєї отруйності протягом багатьох років. Хімічні і біологічні методи виділення та визначення мікотоксинів виключно складні, трудомісткі і не відповідають вимогам масового аналізу. Повсюдна поширеність грибів *Fusarium* і *Alternaria*, наявність у них патогенних і токсиноутворюючих властивостей і пов'язана з цим можливість розвитку грибів, накопичення мікотоксинів не тільки в період вегетації рослин, але і в період зберігання, роблять актуальним завданням розробку молекулярних маркерів для детекції фузарієвих і альтернарієвих грибів у зерні кукурудзи.

Дизайн більшості праймерів, сконструйованих для видо- і родоспецифічної детекції патогенів, розроблено на основі варіабельності послідовностей в регіонах внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної рибосомної ДНК (рДНК). Кластери рибосомних генів завдяки особливостям їхньої структурно-функціональної організації є найбільш перспективними для діагностичного використання. Регіони багатокопійної рДНК, які включають внутрішні транскрибовані спейсери (BTC1 і BTC2), придатні для ампліфікації в ПЛР і містять ділянки, які значно різняться за швидкістю молекулярної еволюції.

Для виявлення та ідентифікації в зерні кукурудзи грибів *Alternaria* spp. та *Fusarium* spp. (на рівні родів та видів *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. brassicae*, *F. macroceras*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*) дібрано системи молекулярних маркерів, що генеруються в процесі ПЛР, на основі послідовностей BTC1 і BTC2 гена 5,8 S рибосомної РНК [4–8]. Переверено родо- і видоспецифічність молекулярних маркерів. Рівень чутливості в двокомпонентній системі (суміш ДНК гриба і кукурудзи) дозволяє детектувати грибку ДНК на фоні 1000-кратної кількості ДНК кукурудзи.

На рисунку 2 наведено приклад тестування ДНК, що виділена з розмолотих зерен кількох ліній кукурудзи без візуальних симптомів ураження, з використанням маркера, видоспецифічного *F. moniliforme*. Наявність фрагмента ампліфікації розміром 561 п. н. свідчить про наявність грибів *F. moniliforme*.

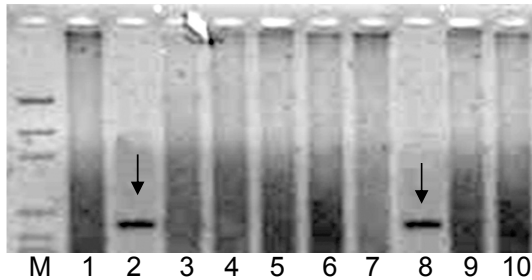


Рис. 2. ПЛР-детекція *F. moniliforme* в візуально здорових зернах кукурудзи. ДНК, що виділена з зерен ліній кукурудзи ГК26 (1), ДС10/3 (2), ОК124 (3), ДК277–10 (4), W275 (5), П343 (6), ВІР27 (7), ОК39 (8), ОК104–4 (9), БК440 (10). М — маркер молекулярної маси рGEM. Стрілками позначено 561 п. н.-фрагмент, специфічний для *F. moniliforme*

До систем молекулярних маркерів для детекції фузаріумних грибів додано маркери генів токсинуотворення *tri5*, *tri6*, *fum5*. На рисунку 3 наведено електрофореграму розподілу продуктів ампліфікації гена *tri5*, що кодує перший ензим біосинтезу трихотеценів — триходієнсінтазу, при опрацюванні маркерів на модельних об'єктах — колекційних штаммах шести видів роду *Fusarium*. 544 п. н. — фрагмент ампліфікації свідчить про наявність гена *tri5* у певному штамі фузаріумних грибів.

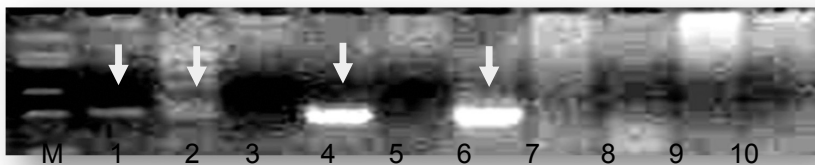


Рис. 3. ПЛР-детекція гена *tri5* у зразках ДНК видів 1 — *F. macroceras* (штам 29), 2—*F. oxysporum* (штам 74), 3—*F. graminearum* (штам 56а), 4—*F. graminearum* (штам ав), 5 — *F. gibbosum* (штам 40), 6 — *F. gibbosum* (штам 38/в), 7 — *F. sporotrichiella* (штам 715в), 8 — *F. sporotrichiella* (штам 714в), 9 — *F. moniliforme* (штам 9.9), 10 — *F. moniliforme* (штам 4.3). М — маркер молекулярної маси рGEM. Стрілками позначено *tri5*-ген специфічний фрагмент розміром 544 п. н.

Діагностична процедура ПЛР-детекції грибів роду *Alternaria* та *Fusarium* у насінні кукурудзи дозволяє швидко й ефективно виявити ураженість зерна (без візуальних симптомів захворювання) та вчасно здійснити захисні заходи, зокрема при закладці зерна на довгострокове зберігання, передпосівну фітосанітарну обробку зерна. Автори також

успішно опрацювали дану систему молекулярних маркерів для тестування продуктів переробки зерна кукурудзи (крупя, борошна) і харчових продуктів з кукурудзи (сухих сумішей дитячого харчування, консервованої, замороженої кукурудзи, кукурудзяних пластівців і паличок) [9, 10], зразків ґрунту [11].

Розробка дуплексних ПЛР-тестів для детекції грибних фітопатогенів. Застосування ПЛР-тестів для детекції патогенних грибів і генів, що контролюють синтез токсинів, безумовно, актуальне. Водночас, значно менше уваги приділяється максимально ефективному використанню вже апробованих ПЛР-тестів, а саме, комплексному проведенню ДНК-аналізу за двома і більше маркерними локусами. Дуплексний (мультиплексний) аналіз є значно інформативнішим і економічним, зокрема при необхідності тестування великої кількості матеріалу, в тому числі харчової сировини (зерна) без візуальних ознак ураження патогенними грибами. У зв'язку з цим, розглядалася можливість проведення дуплексної ПЛР для визначення родо- і видоналежності штамів патогенних грибів [12, 13].

Генетичним матеріалом для розробки дуплексних варіантів ПЛР слугували ДНК штамів грибів видів *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. sporothrihella*, *F. macrocerus*. Матеріал для проведення досліджень люб'язно надала завідувач відділу фітопатології та ентомології СГІ–НЦНС, д. б. н. О. В. Бабаянц.

Оскільки одними з найбільш небезпечних патогенів для людини і тварин є гриби роду *Fusarium*, то ми розглядали можливість застосування дуплексного аналізу для ідентифікації належності штамів до зазначеного роду та його видів *F. graminearum* і *F. moniliforme*, які продукують токсини різної хімічної природи. Зокрема вивчали можливість проведення дуплексних ПЛР за локусами, специфічними для зазначених роду і видів, а саме комбінацій *Its-Fu / GaoA* та *Its-Fu / 53–6* (табл.).

Лімітуючим чинником можливості використання дуплексної ПЛР є взаємокомплементарність праймерів. Як відомо, дизайн пар спрямованих праймерів передбачає мінімізацію (виключення) ймовірності утворення димерів між ними. У разі комбінування пар праймерів, дизайн яких проводили незалежно один від одного, виникнення димерів цілком ймовірна подія. У зв'язку з цим добір комбінацій пар праймерів проводили за програмою FastPCR. Серед планованих варіантів комбінацій праймерів димерів не визначено.

Для проведення дуплексної ПЛР за локусами *Its-Fu / GaoA* і *Its-Fu / 53–6* використовували ДНК, екстраговану зі штамів видів роду *Fusarium*, видів *Aspergillus niger* і *Candida albicans*. Дуплексна ПЛР за локусами *Its-Fu / GaoA* дозволила детектувати два маркерних фрагменти тільки в ДНК штамів виду *F. graminearum* — продукти 389 і 896 п. н., в той час як в інших представників роду *Fusarium* детектували тільки родоспецифічний

Таблиця

Маркерні локуси і праймери для ПЛР-аналізу фітопатогенних грибів [14, 15]

Об'єкт, маркерний локус	Пари праймерів або їх комбінації	Послідовність прай- мерів (5'-3')	Розмір фраг- мента ампліфі- кації, п. н.
Рід <i>Fusarium</i> , локус <i>Its-Fu</i>	Its-FuL Its-FuR	caactcccaaacccctgtga gcgacgattaccagtaacga	389
Вид <i>F. graminearum</i> , локус <i>GaoA</i>	GaoA-V2 Gao-R2	agggacaataagtgcaga actgtgtcagacgacagct	896
Вид <i>F. moniliforme</i> , локус <i>53-6</i>	53-6L 53-6R	tttacgaggcggcgatgggt ggccgtttacctggcttctt	561
Рід <i>Fusarium</i> , вид <i>F. moniliforme</i> , локус <i>Its-Fu /53-6</i>	Its-FuL+Its-FuR + 53-6L+ 53-6R	caactcccaaacccctgtga gcgacgattaccagtaacga tttacgaggcggcgatgggt ggccgtttacctggcttctt	389, 561
Рід <i>Fusarium</i> , вид <i>F. graminearum</i> , <i>Its-Fu/GaoA</i>	Its-FuL+Its- FuR + GaoA- V2+Gao-R2	caactcccaaacccctgtga gcgacgattaccagtaacga agggacaataagtgcaga actgtgtcagacgacagct	389, 896

маркерний фрагмент — 389 п. н. Для ДНК штамів видів *A. niger* і *C. albicans* наявність продуктів реакції не встановлено. Проведення дуплексної ПЛР при використанні комбінації двох пар праймерів до локусів *Its-Fu / 53-6* показало можливість ідентифікації штамів виду *F. moniliforme* серед штамів грибів, представників роду *Fusarium*, оскільки тільки у ДНК штамів *F. moniliforme* детектовані обидва маркерні фрагменти 389 та 561 п. н. (рис. 4).

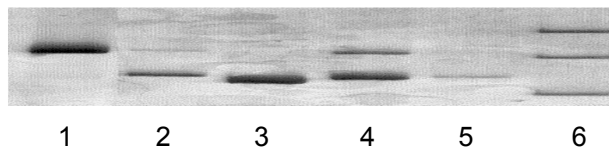


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації за локусом *53-6* зразка *F. moniliforme* (1) та продуктів дуплексної ПЛР, проведеної за локусами *Its-Fu* і *53-6* ДНК штамів видів роду *Fusarium*: *F. moniliforme* (2, 4); *F. graminearum* (3); *F. culmorum* (5). 6 — маркер молекулярної маси *pBlue / Mspl*

Розробку дуплексних ПЛР-тестів проводили при використанні ДНК, екстрагованої з культивованих у пробірці грибних штамів. Також виявлено можливість застосування даного аналізу для ідентифікації патогенних грибів у зерні пшениці. Зокрема, проводили ПЛР-аналіз ДНК, екстрагованої зі стерильного зерна сорту пшениці Одеська напівкарликова та зерна, культивованого у присутності чистої культури патогенних штамів.

Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного. Для молекулярної детекції патогенних штамів аг-

робактерії *Agrobacterium* spp. та виду *A. tumefaciens* (Smith & Townsend (Conn) (збудника бактеріального раку підземних органів хмелю) за ПЛР-методом аналізували консервативні регіони генів патогенності Ті-плазмиди *ipt* (розмір продукту ампліфікації 427 п. н.) та гена вірулентності *virD2* (розмір продукту ампліфікації 224 п. н.), відповідно [16].

Проведено ПЛР-аналіз ДНК зразків хмелю (бруньки) сорту Альта без та з візуальними симптомами захворювання — наявністю корончатих галів («здорові» та «хворі» зразки відповідно), чистої культури *A. tumefaciens* та суміші ДНК здорових зразків хмелю і чистої культури *A. tumefaciens* у співвідношенні 1:1, 5:1, 10:1. Продукти ПЛР розміром 224 та 427 п. н. виявлені у зразках ДНК, виділеної з чистої культури *A. tumefaciens*, всіх уражених зразків хмелю, деяких здорових зразках сумішею ДНК здорових зразків хмелю та *A. tumefaciens* у всіх співвідношеннях.

З використанням даного підходу діагностовані донорні рослини сортів Клон 18 та Альта та дібрані зразки для введення в культуру *in vitro* з 10 чубуків кожного сорту з метою клонального мікророзмноження (рис. 5) [17]. Подальший ПЛР-аналіз даних зразків у процесі розмноження підтвердив відсутність інфекції.

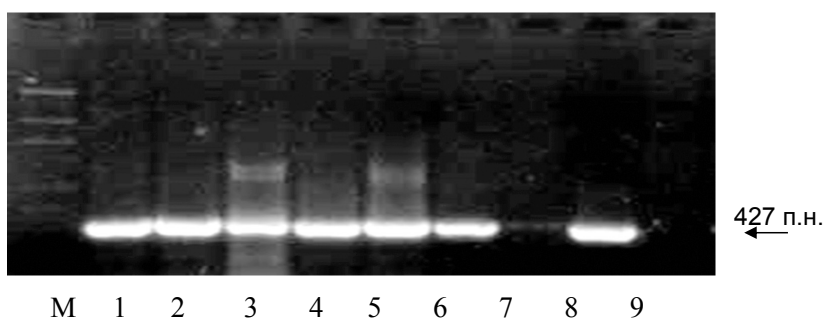


Рис. 5. ПЛР-детекція гена *ipt* в зразках ДНК, виділеної з чистої культури *A. tumefaciens* (1, 2), рослин хмелю сорту Альта з візуальними симптомами ураження (3–6) та без симптомів (7–9). М — маркер молекулярної маси рГЕМ. Стрілкою вказано фрагменти ампліфікації гена *ipt* розміром 427 п. н.

Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного містить етапи: виділення та очищення тотальної ДНК з тканин хмелю; ПЛР-аналіз генів *ipt* і *virD2*, що відповідають за патогенність та вірулентність; гель-електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації, їхньої візуалізації та врахування результатів. Дана біотехнологія є надійним та ефективним підходом для експрес-діагностики бактеріального раку хмелю звичайного на ранніх стадіях патогенезу.

Отже, перевагами молекулярної діагностики фітопатогенів є безпосереднє виявлення в пробі генетичного матеріалу збудника (його ДНК), визначення видового складу збудників, виявлення токсиногенних грибів, отримання результатів у стислі терміни (2–3 дні), специфічність і висока чутливість методу.

Висновки. Розроблені системи молекулярних маркерів для детекції фітопатогенних грибів на рівні родів *Fusarium* та *Alternaria*, видів *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. brassicae*, *F. macroceras*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*, *Plasmopara halstedii*, а також агробактерії *Agrobacterium tumefaciens*. ДНК-тестування може бути корисним для моніторингу ступеня ураженості рослин у польових умовах, для діагностики інфекції, що протікає на ранніх стадіях патогенезу чи у прихованій формі, для експрес-контролю якості рослинної та харчової продукції на наявність інфекції та потенційну токсичність. Визначена доцільність використання дуплексної ПЛР для зниження матеріальних та часових витрат.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. loos R. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds / R. loos, L. Laugustin, S. Rose [et al.] // Plant Pathology. — 2007. — Vol. 56. — P. 209–218.
2. Солоденко А. Е. Детекция возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника с помощью ДНК-маркера / А. Е. Солоденко // Вісник Запорізького національного університету (Біологічні науки). — 2013. — № 3. — С. 5–10.
3. Долгова Е. М. Экспресс-метод оценки подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе / Е. М. Долгова, З. К. Аладьина, В. Н. Михайлова // Селекция и семеноводство. — 1990. — Вып. 68. — С. 50–55.
4. Деревянко О. А. Молекулярные маркеры геномов фузариий для определения инфицированности зерна кукурузы / О. А. Деревянко, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Зб. наук. пр. «Фактори експериментальної еволюції організмів». — 2006. — Т. 3. — С. 93–97.
5. Кожухова Н. Е. Молекулярно-генетична ідентифікація мікотоксичних фузаріїв / Н. Е. Кожухова, О. О. Захарова, Ю. М. Сиволап // Одеський медичний журнал. — 2007. — № 6. — С. 54–56.
6. Захарова О. О. ПЛР-аналіз мінливості геному та розробка технології ідентифікації грибів роду *Fusarium* / О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 2 (3). — С. 48–54.
7. Баранов Ю. О. ПЛР-детекція *Alternaria* spp. в насінні кукурудзи / Ю. О. Баранов, Н. Э. Кожухова // Тези V Міжнар. наук. конф. «Молодь та поступ біології» 12–15.05.2009 р.. — Львів, 2009. — С. 94.
8. Баранов Ю. О. ПЦР-маркеры на основе генов рибосомной РНК для детекции *Alternaria* spp. / Ю. О. Баранов, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Тезиси 14 Междунар. пушинской школы-конф. молодых ученых «Биология — наука XXI века». — Пущино : РФ, 2010. — Т. 1. — С. 227–228.
9. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична детекція грибів роду *Fusarium* у зерні кукурудзи (*Zea mays* L.) : Методичні рекомендації / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, О. О. Захарова. — Одеса, 2007. — 8 с.
10. Zakharova O. Express-detection systems development of *Fusarium* fungi in maize food products / O. Zakharova, K. Hiluk, A. Trigub [et al.] // Тези III Міжнар. конф. молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Еволюція. Адаптація» 15–18.05.2007 р.. — Одеса. — С. 233.

11. Білоіваненко С. О. ПЛР-детекція *Fusarium* spp. у ґрунті / С. О. Білоіваненко, Н. Е. Кожухова // Зб. наук. статей V Міжнар. наук. конф. «Геном рослин» 13–16.10.2008. — Одеса, 2008.. — С. 51–54.
12. Балашова И. А. Применение дуплексной ПЦР для детекции трихотеценовых генов *Tri 5* и *Tri 6* у грибов рода *Fusarium* / И. А. Балашова, О. В. Бабаянц, Г. А. Звездин, Т. М. Корня, Ю. М. Сиволап // Тези конф. «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (Геном рослин VI)». — Одеса, 2010. — С.13.
13. Kujik T. Development of a duplex PCR assay for the simultaneous detection of fusarium poae and fusarium sporotrichioides from wheat / T. Kujik // J. Plant Pathology. — 2008. — V. 90 (3). — P. 441–447.
14. Abd-Elsalam K. A. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data / K. A. Abd-Elsalam, I. N. Aly, M. A. Abdel-Satar [et al.] // African J. Biotechnology. — 2003. — Vol. 2 (4). — P. 82–85.
15. Fakhfakh M. M. Identification and pathogenicity assessment of *Fusarium* spp. sampled from durum wheat fields in Tunisia / M. M. Fakhfakh, A. Yahyaoui, S. Rezgui [et al.] // African Journal of Biotechnology. — 2011. — Vol. 10 (34). — P. 6529–6539.
16. Haas J. M. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J. M. Haas, L. W. Moore, W. Ream [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — Vol. 61, № 8. — P. 2879–2884.
17. Кожухова Н. Е. Спосіб детекції збудника бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* у хмелю звичайного / Н. Е. Кожухова, А. М. Венгер, Ю. М. Сиволап. Патент на корисну модель. — 2011. — Бюл. № 24. — 6 с.

Надійшла 22.05.2015.

UDC 57.08:632.08

Volkova N. E., Solodenko A. Ye., Balashova I. A., Zakharova O. O., Venger A. M. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

MOLECULAR DETECTION OF CAUSAL AGENTS OF CROPS INFECTIOUS DISEASES

Molecular markers were used for detection of crops pathogens: *Fusarium* and *Alternaria* spp. — for maize and soft wheat, *Plasmopara helianthi* — for sunflower, *Agrobacterium tumefaciens* — for hop. The feasibility of duplex PCR using was established.

УДК 57.08:632.08

Волкова Н. Э., Солоденко А. Е., Балашова И. А., Захарова О. А., Венгер А. Н.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Молекулярные маркеры апробированы для детекции возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур: грибов рода *Fusarium* и *Alternaria* — для кукурузы и пшеницы мягкой, *Plasmopara helianthi* — для подсолнечника, агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* — для хмеля обыкновенного. Показана целесообразность использования дуплексной ПЦР.