

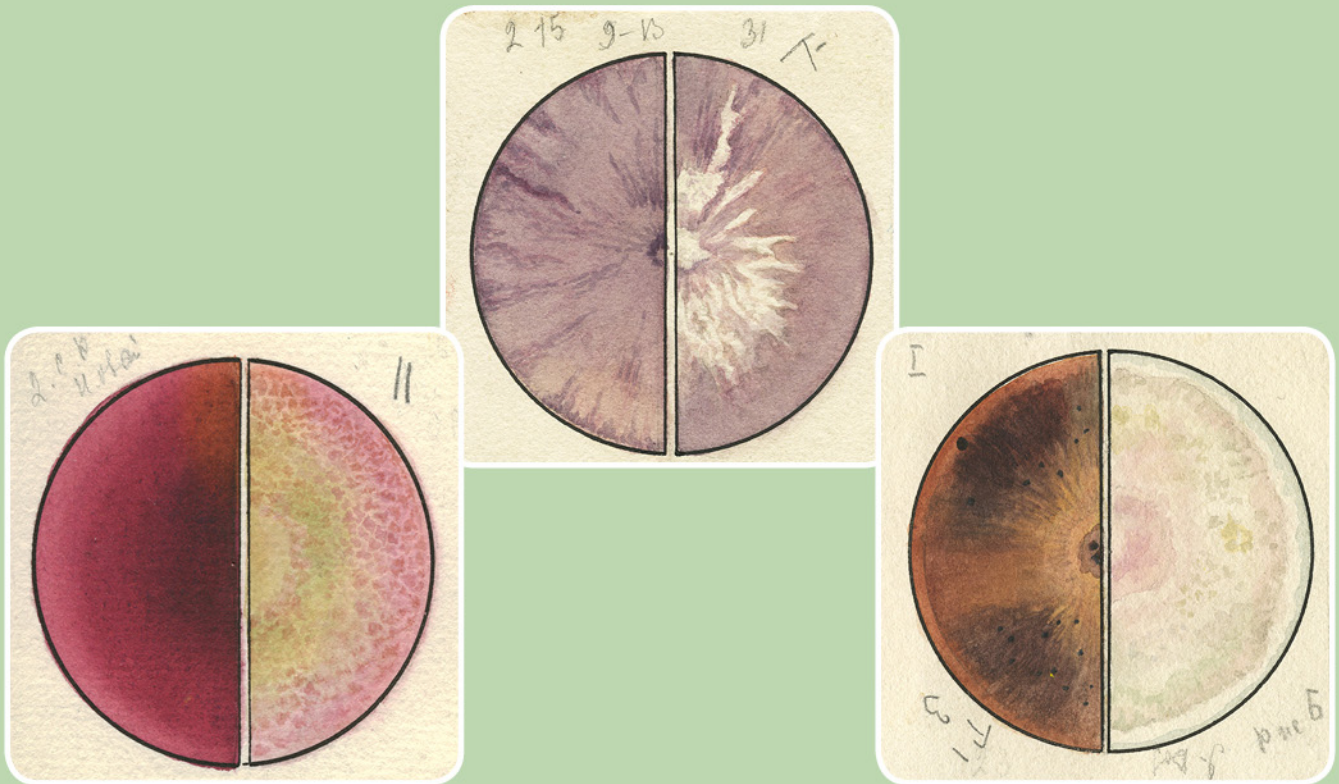


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2025 TOM VOLUME 108 ВЫПУСК ISSUE 2



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРЁХ ВИДОВ ГРИБОВ РОДА *PARASTAGONOSPORA*, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В РОССИИ**И.А. Казарцев*, Ю.В. Зеленева**

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

*ответственный за переписку, e-mail: ikazartsev@vizr.spb.ru

Разработана и валидирована мультиплексная ПЦР-система для специфической диагностики трех патогенов злаковых культур рода *Parastagonospora*, распространенных на территории России: *P. nodorum*, *P. avenae* и *P. pseudonodorum*. В качестве мишени выбран участок гена *YPEL* (*Yippee-like protein*), обладающий достаточным уровнем межвидового полиморфизма для конструирования высокоспецифичных праймеров. Специфичность праймеров подтверждена *in silico*, а также *in vitro* на коллекции референсных изолятов. Разработанные праймеры эффективно работают в мультиплексном формате, обеспечивая селективную детекцию каждого вида. Продемонстрирована высокая чувствительность системы — уверенная детекция достигается при концентрации геномной ДНК в реакционной смеси от 1 пг. Данный набор может быть использован для фитосанитарного мониторинга и исследований в области эпидемиологии септориозов злаковых культур.

Ключевые слова: молекулярная диагностика, пшеница, септориоз, *Parastagonospora nodorum*, *Parastagonospora pseudonodorum*, *Parastagonospora avenae*

Поступила в редакцию: 16.06.2025

Принята к печати: 25.07.2025

Введение

Среди возбудителей септориозов злаков особое положение занимает род *Parastagonospora* (Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales), включающий ряд патогенных видов, поражающих пшеницу, овес и другие злаки (Quaedvlieg et al., 2013). Основной ущерб от этих грибов связан с поражением листьев и колоса, что приводит к снижению фотосинтетической активности растений и ухудшению качества зерна, что в тяжелых случаях может приводить к преждевременному засыханию растений и снижению урожайности (Oliver et al., 2012; Quaedvlieg et al., 2013; An Overview of Stagonospora..., 2020). Заболевания, вызываемые грибами рода *Parastagonospora*, широко распространены в регионах с умеренным и влажным климатом. В последние годы наблюдается увеличение заболеваемости, связанное с изменениями погодных условий и повышенной адаптацией патогенов к фунгицидам (Bhathal and Loughman, 2003; Croll et al., 2021; Kaur et al., 2021; FRAC, 2024).

До 2013 года представителей рода *Parastagonospora* относили к различным родам таким как *Leptosphaeria*, *Phaeosphaeria*, *Septoria* или *Stagonospora*, что было обусловлено сходством некоторых морфологических признаков (размеры и форма конидий, тип плодовых тел) при отсутствии надежных молекулярных критериев разграничения. Новые данные, полученные с применением молекулярно-генетических методов, показали, что эти таксоны являются полифилетическими, что послужило основанием для выделения некоторых их представителей в самостоятельный род *Parastagonospora* (Quaedvlieg et al., 2013). В настоящее время в роде насчитывается порядка 29 видов, большинство из которых не имеют существенного хозяйственного значения (Gao et al., 2024). Наиболее значимый представитель рода — *Parastagonospora nodorum* (syn.

Phaeosphaeria nodorum, *Stagonospora nodorum*), вызывающий поражение листьев, колосьев и семян, что приводит к снижению урожайности и качества зерна (Solomon et al., 2006; McDonald et al., 2012). *P. nodorum* поражает пшеницу, овес, ячмень, тритикале и другие культурные и дикие злаки. Среди других видов, ассоциированных со злаковыми культурами, выделяют *Parastagonospora avenae* (syn. *Phaeosphaeria avenaria*, *Leptosphaeria avenaria*), патоген овса, а также *Parastagonospora pseudonodorum*, встречающийся на пшенице, ранее рассматривавшийся в составе группы *Phaeosphaeria avenaria* f. sp. *tritici* (Pat), но впоследствии выделенный в самостоятельный вид (Quaedvlieg et al., 2013, McDonald et al., 2012; Croll et al., 2021).

На территории России присутствие всех трех вышеуказанных видов, два из которых (*P. nodorum* и *P. pseudonodorum*) поражают пшеницу, подтверждено молекулярными и культурально-морфологическими исследованиями (Зеленева и др., 2022; Зеленева и др., 2023; Zeleneva et al., 2024). Однако, как было отмечено ранее, классические подходы чаще всего не позволяют достоверно проводить диагностику некоторых видов: морфологическая идентификация затруднена из-за перекрывающихся признаков, таких как размеры конидий и характер спороношения. Точная видовая идентификация может быть полезной при планировании защитных мероприятий, фитосанитарном мониторинге и прогнозе, а также оценке резистентности изолятов к фунгицидам. Для рутинной видовой диагностики, требующей экономии времени и ресурсов, могут подойти низкобюджетные конвенционные молекулярно-генетические подходы, например, мультиплексная ПЦР с видоспецифичными праймерами. В настоящей работе предпринята попытка создания диагностического набора для мультиплексной ПЦР-идентификации

P. avenae, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* с использованием в качестве мишени гена *YPEL* (*Yippee-like protein*),

характеризующегося необходимым межвидовым полиморфизмом.

Материалы и методы

Тестирование проводили на культурах трёх целевых видов рода *Parastagonospora*: *P. nodorum*, выделенного с яровой и озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) из Ленинградской области, Алтайского и Краснодарского края; *P. pseudonodorum*, выделенного с яровой и озимой мягкой пшеницы и озимой тритикале (*×Triticosecale*) из Ленинградской области и Краснодарского края; *P. avenae*, выделенного с ярового овса (*Avena sativa*) из Тамбовской области. Идентификация изолятов этих видов осуществлялась по морфологическим признакам с использованием световой микроскопии (Коломиец и др., 2017), а также на основании результатов секвенирования внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), фрагмента гена β -tubulin (*tub2*), фрагмента гена β -xylosidase, проведенного ранее и описанного в наших предыдущих работах по проблемам септориозов (Зеленева и др., 2023; Zeleneva, 2024). Также для оценки неспецифической кросс-реакции праймеров использовался контрольный набор изолятов, включавший по два изолята каждого из таксонов, таких как *Alternaria*, *Fusarium*, *Phoma* и *Septoria tritici*, ранее идентифицированных на основании секвенирования ITS (Коротков и др., 2025; Zeleneva, 2024).

Все культуры были представлены моноконидиальными изолятами, выращенными на картофельно-глюкозном агаре (КА) при температуре 22 °С в условиях 12-часового фотопериода. Геномную ДНК выделяли из 14-дневных культур по модифицированному протоколу с СТАВ (Doyle & Doyle, 1990). Концентрация выделенной ДНК оценивалась с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) с применением набора QuDye® dsDNA HS Assay Kit (Lumiprobe).

Таблица 1. Праймеры, разработанные на основе гена *YPEL*, для идентификации трех видов рода *Parastagonospora*

Table 1. Primers targeting the *YPEL* gene for identification of three *Parastagonospora* species

Название / name	Последовательность (5'→3') / Sequence (5'→3')	Направление / Direction	Специфичность / Specificity
YPEL_Pa	ACATCCTGCATCGATTCCCT	прямой / forward	<i>Parastagonospora avenae</i>
YPEL_Pn	CTCCCCTCTCCCTTGACAA	прямой / forward	<i>Parastagonospora nodorum</i>
YPEL_Pp	TCAAGGCAATCAAGACGTCTA	прямой / forward	<i>Parastagonospora pseudonodorum</i>
YPEL_Par	TGCCCTCCTTGACTTCTCG	обратный / reverse	<i>Parastagonospora</i> sp.

Стандартная реакционная смесь с двумя праймерами для амплификации геномной ДНК финальным объемом 25 мкл содержала: 2.5 мкл 10× ПЦР-буфер (Биолабмикс), 0.5 мкл смеси dNTP (10 мМ), 0.5 мкл прямого праймера (25 мкМ), 0.5 мкл обратного праймера (25 мкМ), 0.15 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед/мкл, Диалат), 1 мкл геномной ДНК и diH₂O до конечного объема. Объем diH₂O в реакционной смеси для мультиплексной ПЦР с использованием трех прямых праймеров уменьшался пропорционально их суммарному объему, объем вносимого обратного праймера не менялся. Условия амплификации: предденатурация (95 °С – 3 мин); 35 циклов: денатурация (95 °С – 30 сек), отжиг (60 °С – 30 сек), элонгация (72 °С – 40 сек); финальная элонгация (72 °С – 5 мин).

Амплифицированные фрагменты разделяли в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (0.5 мкг/мл),

в 1× ТВЕ-буфере (рН 8.2) при 90 В, 60 минут. Для оценки длины фрагментов использовали молекулярный маркер Step100 plus (Биолабмикс). Визуализацию ампликонов проводили на трансиллюминаторе в УФ.

Для оценки чувствительности ПЦР использовалась серия из восьми 10-кратных разведений ДНК (от 1 нг/мкл до 0.1 фг/мкл). В ПЦР добавляли по 1 мкл одного из разведений, получая финальный объем реакционной смеси 25 мкл. Лимит обнаружения определяли, как минимальную концентрацию, при которой сохранялся стабильный амплификационный сигнал.

Праймеры проектировались с использованием сервиса Primer3 (v. 2.3.7, <https://primer3.ut.ee/>) со стандартными параметрами настроек. Оценка параметров потенциальных последовательностей праймеров проводилась с использованием NCBI Primer-BLAST. В итоге для дальнейшей работы были выбраны три прямых праймера: YPEL_Pa – специфичный *P. avenae*, YPEL_Pn – *P. nodorum*, YPEL_Pp – *P. pseudonodorum*. В качестве общего для всех прямых праймеров был использован обратный праймер YPEL_Par (табл. 1).

Для оценки чувствительности ПЦР использовалась серия из восьми 10-кратных разведений ДНК (от 1 нг/мкл до 0.1 фг/мкл). В ПЦР добавляли по 1 мкл одного из разведений, получая финальный объем реакционной смеси 25 мкл. Лимит обнаружения определяли, как минимальную концентрацию, при которой сохранялся стабильный амплификационный сигнал.

Для оценки чувствительности ПЦР использовалась серия из восьми 10-кратных разведений ДНК (от 1 нг/мкл до 0.1 фг/мкл). В ПЦР добавляли по 1 мкл одного из разведений, получая финальный объем реакционной смеси 25 мкл. Лимит обнаружения определяли, как минимальную концентрацию, при которой сохранялся стабильный амплификационный сигнал.

Вся работа проводилась с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Инновационные технологии защиты растений» ФГБНУ ВИЗР.

Результаты и обсуждение

Анализ последовательностей гена *YPEL*, полученных из 24 геномных сборок изолятов *Parastagonospora* spp. из Европы, Ближнего востока, Северной и Южной Америки, Австралии и Африки, выявил устойчивые межвидовые нуклеотидные различия, которые могут быть использованы для разработки праймеров. Финальные прямые праймеры (*YPEL_Pa*, *YPEL_Pn*, *YPEL_Pp*), расположенные в переменных областях, в сочетании с общим обратным праймером *YPEL_Par*, который находится в консервативном участке, обеспечили амплификацию фрагментов различной длины. Попарное использование прямых и обратного праймеров позволило прогнозировать дискретные ампликоны следующих длин для соответствующих видов: *P. avenae* (*YPEL_Pa/YPEL_Par*) – 373 п.н., *P. nodorum* (*YPEL_Pn/YPEL_Par*) – 594 п.н., *P. pseudonodorum* (*YPEL_Pp/YPEL_Par*) – 759 п.н. (рис. 1). Указанные пары продемонстрировали высокую специфичность при анализе *in silico* в сервисе Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), не проявляя комплементарность с последовательностями других видов *Parastagonospora* или грибов из других родов.

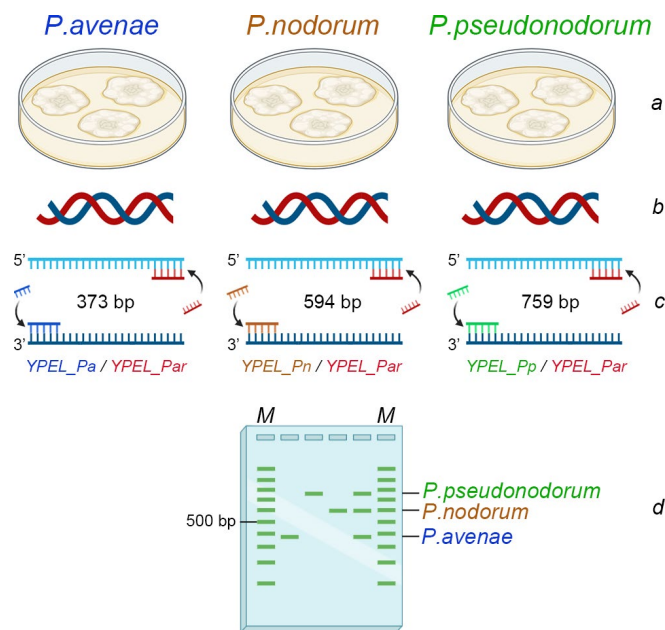


Рисунок 1. Дизайн мультиплексного ПЦР с комбинациями праймеров *YPEL_Pa/YPEL_Par*, *YPEL_Pn/YPEL_Par*, *YPEL_Pp/YPEL_Par*, специфичными соответственно *Parastagonospora avenae*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*: *a* – выделение грибов на питательные среды, *b* – выделение геномной ДНК грибов, *c* – ПЦР со специфичными праймерами (указаны ожидаемые длины фрагментов), *d* – визуализация результатов ПЦР методом агарозного гель-электрофореза.

Условные обозначения: М – маркер длин ДНК

Figure 1. Design of multiplex PCR with primer combinations *YPEL_Pa/YPEL_Par*, *YPEL_Pn/YPEL_Par*, *YPEL_Pp/YPEL_Par* specific to *Parastagonospora avenae*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum* respectively: *a* – fungal isolation on culture media, *b* – genomic DNA extraction from fungi, *c* – PCR with species-specific primers (expected fragment lengths indicated), *d* – visualization of PCR results by agarose gel electrophoresis. Legend: M – DNA size marker

При тестировании *in vitro* пар *YPEL_Pa/YPEL_Par*, *YPEL_Pn/YPEL_Par* и *YPEL_Pp/YPEL_Par* по отдельности для изолятов *P. avenae*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* в агарозном геле четко визуализировались ампликоны ожидаемой длины (рис. 2 (a, b, c)). Попарное тестирование каждой комбинации (*YPEL_Pa/YPEL_Par*, *YPEL_Pn/YPEL_Par*, *YPEL_Pp/YPEL_Par*) показало амплификацию только с ДНК соответствующего вида: никаких побочных продуктов при использовании ДНК двух других видов не образовывалось. В совместной реакции трёх прямых и одного обратного праймера по-прежнему наблюдались только ампликоны целевых организмов без фоновой или неспецифической амплификации, что подтверждает сохранение видоспецифичности даже при совместном использовании всех трёх прямых праймеров (рис. 2 (d)). В реакции с неродственными *Parastagonospora* таксонами праймеры не давали продуктов амплификации, в то время как положительные контроли (*P. avenae*, *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*) дали ожидаемые продукты, что подтверждает хорошую специфичность набора.

Для определения предела чувствительности каждая пара праймеров отдельно тестировалась на серии десятикратных разведений геномной ДНК (1 нг → 0.1 нг → 0.01 нг → 1 пг → 0.1 пг → 0.01 пг → 1 фг → 0.1 фг) в объёме 25 мкл реакционной смеси (рис. 3). Установлено, что минимальная концентрация ДНК, при которой сохраняется воспроизводимая амплификация, для *P. avenae* составляет 0.1 пг, для *P. nodorum* – 0.01 пг, а для *P. pseudonodorum* – 1 пг. Таким образом, наиболее чувствительными оказались пары праймеров для *P. avenae* и *P. nodorum*. Однако

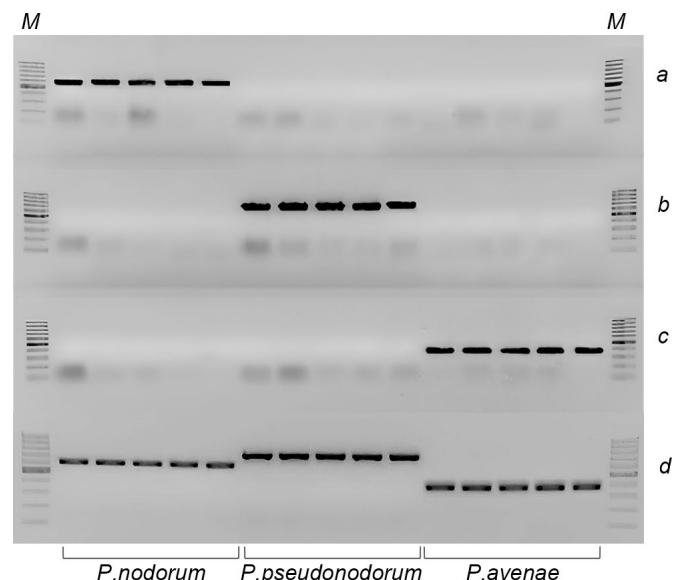


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, демонстрирующая специфичность пар праймеров *YPEL_Pn/YPEL_Par*, *YPEL_Pp/YPEL_Par*, *YPEL_Pa/YPEL_Par*, в индивидуальных (*a, b, c* соответственно) и мультиплексных (*d*) реакциях.

Условные обозначения: М – маркер длин ДНК

Figure 2. Electropherogram of PCR products demonstrating the specificity of the primer pairs *YPEL_Pn/YPEL_Par*, *YPEL_Pp/YPEL_Par*, and *YPEL_Pa/YPEL_Par* in individual (*a, b, and c* respectively) and multiplex reactions (*d*). Legend: M – DNA size marker

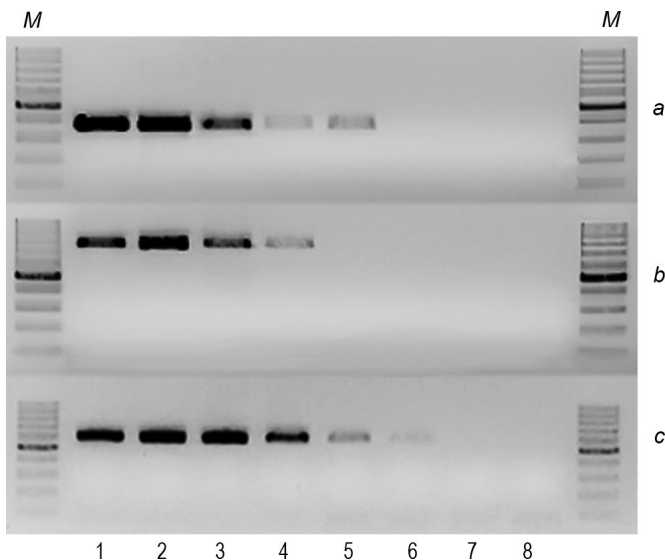


Рисунок 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, демонстрирующая предел чувствительности пар праймеров YPEL_Pa/YPEL_Par, YPEL_Pp/YPEL_Par, YPEL_Pn/YPEL_Par (a, b, c соответственно) в реакционной смеси объемом 25 мкл.

Условные обозначения: 1–8 – серия 10^x разведений от 1 нг до 0.1 фг геномной ДНК; М – маркер длин ДНК

Figure 3. Electropherogram of PCR products demonstrating the sensitivity limit of the primer pairs YPEL_Pa/YPEL_Par, YPEL_Pp/YPEL_Par, and YPEL_Pn/YPEL_Par (a, b, and c respectively) in a 25 µL reaction mixture.

Legend: 1–8 – a 10-fold dilution series ranging from 1 ng to 0.1 fg of genomic DNA; M – DNA size marker

при использовании метода в мультиплексном формате, с целью сохранения надёжности диагностики для всех трёх видов, следует использовать пробу с концентрацией геномной ДНК не ниже 1 пг на реакцию — в соответствии с пределом чувствительности праймеров, специфичных к *P. pseudonodorum*.

Результаты настоящего исследования демонстрируют успешное применение набора высокоспецифичных ПЦР-праймеров для одновременной идентификации трёх видов рода *Parastagonospora*, патогенных для злаковых культур: *P. avenae*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*. Использование гена *YPEL* в качестве мишени показало высокую дискриминационную способность для указанных таксонов, при сохранении чувствительности до концентрации 1 пг геномной ДНК — в соответствии с порогом наименее чувствительной пары праймеров.

Представленный метод диагностики *Parastagonospora* spp. обладает высокой видоспецифичностью, не дает кросс-реакций с неродственными фитопатогенами и отличается достаточной чувствительностью для применения в фитосанитарной практике. Мультиплексный формат анализа обеспечивает экономичность и оперативность, позволяя выявлять целевые виды.

Учитывая подтверждённое присутствие всех трёх видов *Parastagonospora* на территории России, внедрение разработанного ПЦР-набора позволит повысить точность оценки устойчивости сортов пшеницы и овса к септориозу; найдет применение в мониторинге эпифитотийных ситуаций и прогнозировании вспышек заболевания; будет являться начальным этапом в изучение чувствительности патогенов к фунгицидам, что позволит отслеживать изменения в популяциях грибов и адаптировать стратегии защиты посевов.

Благодарности

Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (проект 19-76-30005-П)

Библиографический список (References)

- Зеленева ЮВ, Аблова ИБ, Судникова ВП, Мохова ЛМ, Конькова ЭА (2022) Видовой состав возбудителей септориозов пшеницы в европейской части России и идентификация генов-эффекторов SNTOXA, SNTOX1 и SNTOX3. *Микология и фитопатология* 56(6):441–447. <https://doi.org/10.31857/s0026364822060113>
- Зеленева ЮВ, Ганнибал ФБ, Казарцев ИА, Судникова ВП (2023) Молекулярная идентификация, гены-эффекторы и вирулентность изолятов гриба *Parastagonospora nodorum* из Алтайского края (Россия). *Микология и фитопатология* 57(5):362–371. <https://doi.org/10.31857/s0026364823050124>
- Коломиец ТМ, Пахолкова ЕВ, Дубовая ЛП (2017) Отбор исходного материала для создания сортов пшеницы с длительной устойчивостью к септориозу. М.: Печатный город. 56 с.
- Коротков ЮА, Зеленева ЮВ, Иванова ОМ, Рязанова ТС (2025) Идентификация грибов, выделенных из семян подсолнечника сортов Тамбовской селекции. *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета* 1(80):61–66
- An Overview of *Stagonospora nodorum* Leaf and Glume Blotch (2020) <https://cropprotectionnetwork.org/publications/an-overview-of-stagonospora-nodorum-leaf-and-glume-blotch>. <https://doi.org/10.31274/cpn-20200922-2> (15.06.2025)
- Bhathal JS, Loughman R (2003) Yield reduction in wheat in relation to leaf disease from yellow (tan) spot and septoria nodorum blotch. *Eur J Plant Pathol* 109: 435–443. <https://doi.org/10.1023/a:1024277420773>
- Croll D, Crous PW, Pereira D et al (2021) Genome-scale phylogenies reveal relationships among *Parastagonospora* species infecting domesticated and wild grasses. *Persoonia* 46:116–128. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.04>
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- FRAC (2024) Sterol Biosynthesis Inhibitor (SBI) working group. <https://www.frac.info/media/lxsf03ev/minutes-of-the-2024-sbi-meeting-recommendations-for-2024-from-jan-19th-and-march-21st-2024.pdf> (15.06.2025)
- Gao Y, Zhong T, Eungwanichayapant PD, Jayawardena RS, Hyde KD, Faraj TKh, Wanasinghe DN, Gui H (2024) Two new species of *Parastagonospora* and a new species of *Phaeoseptoriella* (Phaeosphaeriaceae, Pleosporales) from grasslands in Yunnan Province, China. *MycKeys* 109:239–263
- Kaur N, Mullins C, Kleczewski NM, Mehl HL (2021) Occurrence of Quinone Outside Inhibitor Resistance

- in Virginia Populations of *Parastagonospora nodorum* Infecting Wheat. *Plant Dis* 105:1837–1842. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-19-2288-re>
- McDonald MC, Razavi M, Friesen TL, Brunner PC, McDonald BA. (2012) Phylogenetic and population genetic analyses of *Phaeosphaeria nodorum* and its close relatives indicate cryptic species and an origin in the Fertile Crescent. *Fungal Genet Biol* 49(11):882–895
- Oliver RP, Friesen TL, Faris JD, Solomon PS (2012) *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance. *Annu Rev Phytopathol* 50:23–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173019>
- Quaedvlieg W, Verkley GJ, Shin HD, Barreto RW, Alfenas AC, Swart WJ et al (2013) Sizing up *Septoria*. *Stud Mycol* 75(1):307–390. <https://doi.org/10.3114/sim0017>
- Roxström-Lindquist K, Faye I (2001) The *Drosophila* gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. *Insect Mol Biol* 10(1):77–86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2001.00239.x>
- Solomon PS, Lowe RGT, Tan K-C, Waters ODC, Oliver RP (2006) *Stagonospora nodorum*: cause of *Stagonospora nodorum* blotch of wheat. *Mol Plant Pathol* 7(3):147–156.
- Syme RA, Tan KC, Rybak K, Friesen TL, McDonald BA, Oliver RP, Hane JK (2018) Pan-*Parastagonospora* Comparative Genome Analysis-Effector Prediction and Genome Evolution. *Genome Biol Evol* 10(9):2443–2457
- Zeleneva YV, Ablova IB, Mokhova LM (2024) Species Composition of Wheat Septoria Pathogens and Identification of Effector Genes in *Parastagonospora* spp. Populations of Krasnodar Krai and Leningrad Oblast of the Russian Federation. *Russ Agricult Sci* 50:383–390. <https://doi.org/10.3103/s1068367424700393>

Translation of Russian References

- Zeleneva YuV, Ablova IB, Mokhova LM (2024) Species composition of Septoria blotch of cereal crops and identification of effector genes in populations of *Parastagonospora* spp. on the territory of Krasnodar and Leningrad regions of the Russian Federation. *Rossiyskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka*. 3:50–55. <https://doi.org/10.31857/s2500262724030101>
- Zeleneva YuV, Ablova IB, Sudnikova VP, Mokhova LM, Konkova EA (2022) Species composition of wheat Septoria pathogens in the European part of Russia and identifying SNTOXA, SNTOX1, and SNTOX3 effector genes. *Mikologiya i fitopatologiya* 56(6):441–447. <https://doi.org/10.31857/s0026364822060113>
- Zeleneva YuV, Gannibal PhB, Kazartsev IA, Sudnikova VP (2023) Molecular identification, effector genes and virulence of isolates of *Parastagonospora nodorum* from Altai krai (Russia). *Mikologiya i fitopatologiya* 57(5):362–371. <https://doi.org/10.31857/s0026364823050124>
- Kolomiets TM, Paholkova EV, Dubovaya LP (2017) Selection of source material for the creation of wheat varieties with long-term resistance to Septoria spot. Moscow: Pechatnyj gorod. 56 p.
- Korotkov YuA, Zeleneva YuV, Ivanova OM, Ryazanova TS (2025) Identification of fungi isolated from sunflower seeds of Tambov breeding varieties. *Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 1(80):61–66.

Plant Protection News, 2025, 108(2), p. 107–111

OECD+WoS: 1.06+RQ (Mycology); 1.06+QU (Microbiology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2025-108-2-17138>

Short communication

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF MULTIPLEX PCR FOR IDENTIFICATION OF THREE FUNGAL SPECIES OF THE GENUS *PARASTAGONOSPORA* WIDESPREAD IN RUSSIA

I.A. Kazartsev*, Yu.V. Zeleneva

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: ikazartsev@vizr.spb.ru

A multiplex PCR system has been developed and validated for the specific detection of three prevalent in Russia cereal pathogens, belonging to the genus of *Parastagonospora*: *P. nodorum*, *P. avenae*, and *P. pseudonodorum*. The target region selected was a fragment of the *YPEL* (Yippee-like protein) gene, which exhibits sufficient interspecies polymorphism for designing highly specific primers. Primer specificity was confirmed *in silico* and *in vitro* using a collection of reference isolates. The developed primers functioned effectively in a multiplex format, enabling species-specific detection. The system demonstrated high sensitivity (detection limit: 1 pg of genomic DNA per reaction). This assay can be utilized for phytosanitary monitoring and research on the epidemiology of Septoria diseases in cereal crops.

Keywords: molecular diagnostics, Septoria nodorum blotch, wheat, *Parastagonospora nodorum*, *Parastagonospora pseudonodorum*, *Parastagonospora avenae*

Submitted: 16.06.2025

Accepted: 25.07.2025