

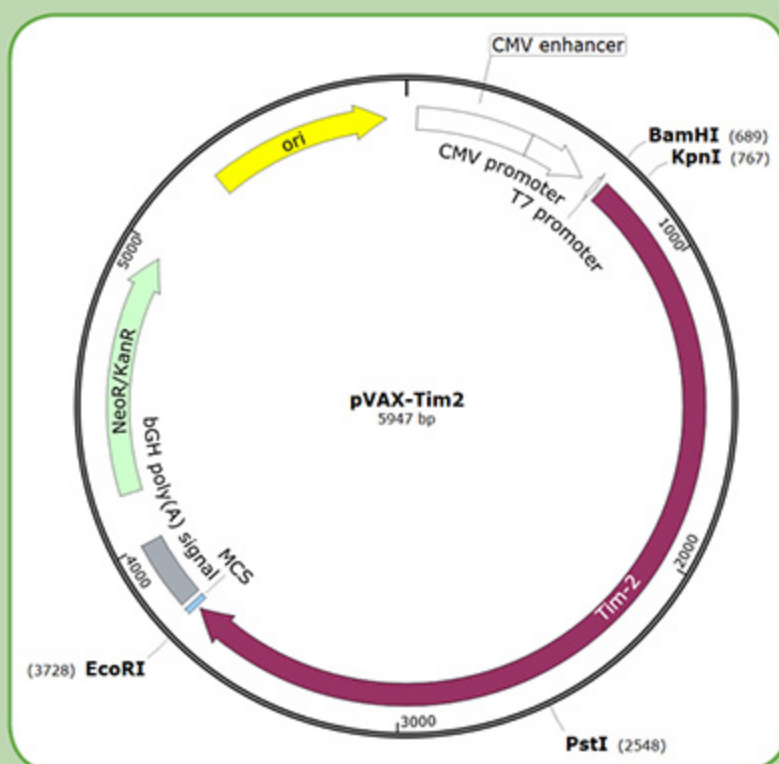


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2024 TOM VOLUME 107 ВЫПУСК ISSUE 3



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

На обложке: рисунок 1 из статьи С.А. Тимофеева, А.Г. Шухаловой, О.А. Павловой (стр. 132) [ориг.]

Cover page: figure 1 from S.A. Timofeev, A.G. Shukhalova, O.A. Pavlova (p. 132) [orig.]

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”
(ФГБНУ ВИЗР)

All-Russian Institute of Plant Protection

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

В Е С Т Н И К
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2024 ТОМ **107** ВЫПУСК **3**
VOLUME ISSUE

Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia
2024

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Научно-теоретический рецензируемый журнал

Основан в 1939 г.

Издание возобновлено в 1999 г.

Учредитель: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР)

Зарегистрирован в ГК РФ по печати № 017839 от 03 июля 1998 г.

Главный редактор: В.А. Павлюшин

Зам. гл. редактора: И.А. Белоусов, Ю.С. Токарев

Ответственный секретарь: А.Г. Конончук

Технический секретарь: С.Г. Удалов

Корректоры англоязычных текстов: И.А. Белоусов, Ю.С. Токарев

Журнал «Вестник защиты растений» (ISSN: 1727-1320) включен в «Перечень изданий ВАК РФ» по следующим научным специальностям и отраслям науки:

1.5.14 – Энтомология (биологические науки),

1.5.18 – Микология (биологические и сельскохозяйственные науки),

4.1.1 – Общее земледелие. Растениеводство (биологические и сельскохозяйственные науки),

4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические и сельскохозяйственные науки),

4.1.3 – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (биологические и сельскохозяйственные науки)

Индексируется в RSCI, РИНЦ, CrossRef & DOAJ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Афанасенко О.С., дбн, академик РАН, ВИЗР

Белоусов И.А., кбн, ВИЗР

Белякова Н.А., кбн, ВИЗР

Власов Д.Ю., дбн, СПбГУ

Ганнибал Ф.Б., кбн, ВИЗР

Гончаров Н.Р., ксxn, ВИЗР

Гричанов И.Я., дбн, ВИЗР

Дзянь Синьфу, профессор, КНР

Долженко В.И., дсxn, академик РАН, ВИЗР

Егоров Е.А., дэн, академик РАН, СКФНЦСиВ

Игнатов А.Н., дбн, РУДН

Косман Е., профессор, Израиль

Каракотов С.Д., дхн, академик РАН,

 ЗАО “Щелково Агрохим”

Краснов Ч., PhD, Израиль

Кюссон М., PhD, Канада

Лаврищев А.В., дсxn, СПбГАУ

Лаптев А.Б., дбн, ООО “ИЦЗР”

Лунева Н.Н., дбн, ВИЗР

Лысов А.К., ктн, ВИЗР

Мавроди Д., профессор, США

Мехрабади М., Иран

Намятова А.А., кбн, ЗИН

Новикова И.И., дбн, ВИЗР

Павлюшин В.А., дбн, академик РАН, ВИЗР

Радченко Е.Е., дбн, ВИР

Савченко И.В., дбн, академик РАН, ВИЛАР

Санин С.С., дбн, академик РАН, ВНИИФ

Сидельников Н.И., дсxn, академик РАН, ВИЛАР

Синев С.Ю., дбн, ЗИН

Соколова Ю.Я., дбн, США

Сорока С.В., дсxn, профессор, Белоруссия

Сухорученко Г.И., дсxn, ВИЗР

Ули-Маттила Т., профессор, Финляндия

Токарев Ю.С., дбн, ВИЗР

Упадышев М.Т., дбн, член-корреспондент РАН, ВСТИСП

Фролов А.Н., дбн, ВИЗР

Хлесткина Е.К., дбн, ВИР

Шамшев И.В., кбн, ЗИН

Шпанев А.М., дбн, АФИ

Ответственные редакторы выпуска:

О.С. Афанасенко, И.А. Белоусов, Ф.Б. Ганнибал, Ю.С. Токарев

Россия, 196608, Санкт-Петербург – Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ВИЗР

Email: vestnik@vizr.spb.ru

<https://plantprotect.ru>



Содержимое данного выпуска распространяется на условиях Creative Commons Attribution License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENT

Полнотекстовые статьи / Full-text articles**Микотоксикологическая характеристика зерна озимой пшеницы урожая 2023 года из Краснодарского края****Е.П. Арабина, А.С. Орина, О.П. Гаврилова, Н.Н. Гогина**

Analysis of fungal and mycotoxin contamination of winter wheat grain grown in Krasnodarskiy Krai in 2023

E.P. Arabina, A.S. Orina, O.P. Gavrilova, N.N. Gogina 108

Идентификация возбудителя стеблевого меланоза пшеницы *Pseudomonas cichorii* методом ПЦР в режиме «реального времени»**Е.В. Воронов, О.Ю. Словарева, А.А. Десятерик, М.О. Кондратьев, А.Н. Игнатов**Identification of stem melanosis of wheat (*Pseudomonas cichorii*) by real-time PCR

E.V. Voronov, O.Y. Slovareva, A.A. Desyaterik, M.O. Kondratiev, A.N. Ignatov 121

Подбор фрагмента δ -латроинсектотоксина из яда каракурта *Latrodectus tredecimguttatus* для высокоэффективной бактериальной экспрессии**С.А. Тимофеев, А.Г. Шухалова, О.А. Павлова**Selection of a δ -latroinsectotoxin fragment from *Latrodectus tredecimguttatus* venom for efficient bacterial expression

S.A. Timofeev, A.G. Shukhalova, O.A. Pavlova 130

Видовой состав сорных растений в посевах сои *Glycine max* в условиях центрального Черноземья (на примере Белгородской области)**Н.Н. Лунева, Е.Н. Мысник, Т.И. Воронкина**Species composition of weeds in soybean *Glycine max* crops in the Belgorod region

N.N. Luneva, E.N. Mysnik, T.I. Voronkina 137

Хроника / Chronicle**Памяти Олега Вениаминовича Сундукова**

In memory of Oleg V. Sundukov 144

МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗЕРНА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ УРОЖАЯ 2023 ГОДА ИЗ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

Е.П. Арабина^{1,2}, А.С. Орина^{1*}, О.П. Гаврилова¹, Н.Н. Гогина³

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

³Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, Сергиев Посад

* ответственный за переписку, e-mail: orina-alex@yandex.ru

С помощью количественной ПЦР (кПЦР) и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) выявлено повсеместное присутствие грибов *Fusarium* и *Alternaria* и продуцируемых ими микотоксинов в зерне озимой пшеницы, выращенной в Краснодарском крае в 2023 году. Во всех образцах обнаружена ДНК грибов *Fusarium*, продуцирующих трихотеценовые микотоксины (Tгi-*Fusarium*) в диапазоне количеств 244–23537 пг/мкг. Доля образцов, в которых выявлена ДНК грибов *Fusarium*, продуцирующих фумонизины (Fum-*Fusarium*), в количестве от 27 до 923 пг/мкг, составила 35%. В зерне всех образцов выявлена ДНК грибов *Alternaria*: содержание ДНК *Alternaria* секции *Alternaria* в среднем оказалось 3630±144 пг/мкг, а ДНК *Alternaria* секции *Infectoriae* – 6814±214 пг/мкг. Из анализированных 36 микотоксинов в зерне обнаружены 17, в каждом образце от 3 до 11 соединений. Среди микотоксинов грибов *Fusarium* чаще других в зерне встречались дезоксиниваленол (ДОН) (в 79% образцов), дезоксиниваленол-3-глюкозид (в 50%), НТ-2 токсин (в 47%) и боверицин (в 70%). В двух образцах зерна (6% от общего числа) обнаружено превышение предельно допустимой концентрации ДОН в 2 и 3 раза. Установлена достоверная положительная связь между количествами ДНК Tгi-*Fusarium* и ДОН, а также зеараленоном, что указывает на доминирование гриба *F. graminearum* среди возбудителей фузариоза зерна в этом регионе. Продемонстрирована высокая встречаемость в зерне микотоксинов грибов *Alternaria* – альтернариола (82% загрязнённых образцов), тентоксина (ТЕН) (100%) и тенуазоновой кислоты (79%). Установлены достоверные связи между содержанием ДНК *Alternaria* секции *Alternaria* и двух микотоксинов – метиловым эфиром альтернариола и ТЕН. Выявлены достоверные различия между образцами из разных районов Краснодарского края по контаминации зерна грибами *Fusarium* и *Alternaria*, а также их микотоксинами.

Ключевые слова: грибы, ДНК, *Alternaria*, *Fusarium*, количественная ПЦР, микотоксины, ВЭЖХ-МС/МС

Поступила в редакцию: 05.09.2024

Принята к печати: 18.10.2024

Введение

В России лидером по площади выращивания озимой пшеницы является Южный федеральный округ (ФО), в котором расположены 43.7% посевов этой культуры (15688 тыс. га) в 2023 г., преимущественно сосредоточенных в Краснодарском крае (Федеральная служба государственной статистики, 2024).

Одним из наиболее экономически значимых заболеваний озимых и яровых зерновых культур в Краснодарском крае является фузариоз, вызываемый различными видами грибов рода *Fusarium*. Кроме прямой потери урожая, ухудшения семенных качеств зерна, вредоносность фузариоза также заключается в загрязнении получаемой продукции микотоксинами – токсичными вторичными метаболитами грибов *Fusarium*. К наиболее опасным из них относятся трихотеценовые микотоксины, включающие дезоксиниваленол (ДОН), Т-2 токсин, ниваленол (НИВ) и др., а также фумонизины (ФУМ). В продовольственном зерне пшеницы и продуктах его переработки нормируется содержание трёх микотоксинов, образуемых грибами рода *Fusarium*: количество Т-2 токсина не должно превышать 100 мкг/кг, ДОН – 700 мкг/кг и зеараленона (ЗЕН) – 1000 мкг/кг (ТР ТС 021/2011; ТР ТС 015/2011).

Из всего разнообразия грибов рода *Fusarium*, колонизирующих зерно, в Южном ФО превалирует агрессивный патоген *F. graminearum*, продуцирующий ДОН и ЗЕН, однако также могут встречаться другие виды этого рода с разнообразными жизненными стратегиями и взаимодействующими с растением как эндофиты, сапротрофы или патогены (Жалиева, 2010; Гагкаева и др., 2012; Гагкаева, Гаврилова, 2014; Шипилова и др., 2014; Горьковенко и др., 2017; Мустафина, Таракановский, 2018; Жемчужина и др., 2020).

Начиная с 2010 г. в образцах зерна из Краснодарского края стали массово выявлять грибы *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae*, которые активно синтезируют Т-2 и НТ-2 токсины, что приводит к накоплению этих микотоксинов в зерне (Гагкаева и др., 2012; Гаврилова, Гагкаева, 2020). В то же время отмечена низкая (не более 3%) заражённость зерна пшеницы *F. proliferatum* и *F. verticillioides* – представителями комплекса видов *Fusarium fujikuroi* (FFSC), – продуцентами ФУМ (Гагкаева и др., 2012). Однако ранее сообщалось о загрязнённости ФУМ 50% образцов пшеницы, выращенной в 2011–2014 гг. на юге России (Дробин и др., 2015), а также об обнаружении этих микотоксинов в

двух образцах пшеницы из Краснодарского края урожая 2017 г. в количестве 410 и 1990 мкг/кг (Kononenko et al., 2020).

Чаще грибов рода *Fusarium*, в образцах зерна из Южного ФО встречаются грибы рода *Alternaria* (до 100% образцов), преимущественно представители секций *Alternaria* и *Infectoriae*, частота обнаружения которых в разные годы может значительно варьировать (Ганнибал, 2018). Эти грибы повсеместно распространены в микобиоте зерновых культур и, по всей видимости, обитают в зерне как эндофиты (Sun et al., 2023; Sharon et al., 2024), при этом не оказывая существенного влияния на показатели качества зерна (Kosiak et al., 2004; Орина и др., 2020). Однако, грибы *Alternaria* продуцируют разнообразные микотоксины, среди которых наиболее часто в зерне обнаруживают альтернариол (АОЛ), монометилловый эфир альтернариола (АМЭ), тентоксин (ТЕН) и тенуазоновую кислоту (ТК) (Tralamazza et al., 2018; Masiello et al., 2022). В России содержание этих и других альтернариотоксинов в зерне не регламентируется, несмотря на их негативное действие на организм потребителей зернопродукции (Chen et al., 2021; Аксёнов и др., 2023). Ранее неоднократно выявляли критически высокие значения микотоксинов, продуцируемых *Alternaria*, в зерне из разных регионов РФ (Kononenko et al., 2020; Орина и др., 2020, 2021; Седова и др., 2024).

Наличие проблемы заражённости зерновых культур токсинопродуцирующими грибами ведет к необходимости микотоксикологической характеристики получаемого

зерна. Благодаря способности одного вида одновременно продуцировать различные метаболиты, встречаемость в зерне нескольких разных грибов может представлять угрозу его загрязнения спектром микотоксинов.

За последние годы количественная ПЦР (кПЦР) зарекомендовала себя как объективный аналитический метод количественного выявления биомассы грибов, выраженного через содержание их ДНК, в растительном материале, и успешность его применения для оценки заражённости зерна разными таксономическими группами продемонстрирована неоднократно (Гагкаева и др., 2017; Gagkaeva et al., 2019; Orina et al., 2018, 2020, 2021; Каракотов и др., 2019). Определяемое этим методом содержание ДНК целевого объекта (токсинопродуцирующего гриба или группы близкородственных видов) во многих случаях позволяет уверенно прогнозировать содержание продуцируемых им/ими микотоксинов вследствие высокой достоверной положительной связи между этими количественными показателями (Gagkaeva et al., 2018, 2019; Orina et al., 2021; Лебедин и др., 2021). Другими преимуществами использования кПЦР являются её высокая специфичность, объективность и быстрота получения результатов, что может являться решающим фактором при принятии решения о целевом назначении той или иной партии зерна.

Цель работы – охарактеризовать образцы озимой пшеницы, выращенной в Краснодарском крае в 2023 г., по заражённости грибами *Alternaria* и *Fusarium* и контаминации микотоксинами.

Материалы и методы

Образцы зерна

Проанализировано 34 образца озимой пшеницы, выращенной в 19 хозяйствах из восьми районов Краснодарского края (Белоглинский, Динской, Калининский, Каневской, Кореновский, Красноармейский, Тбилисский и Успенский) в 2023 г. Из них 26 были отобраны из партий зерна товарного, а остальные – из партий семенного назначения (табл. 1). Лабораторные анализы выполнены в период апрель – май 2024 г.

Из каждого среднего образца отбирали навески по 20 г зерна, которые затем размалывали с помощью лабораторной мельницы Stegler ЛЗМ-1-02 (Stegler, Китай) при 22000 об/мин в течение 1 мин. Полученные размолы хранили при -20°C .

Экстракция ДНК и измерение её концентрации

Экстракцию общей ДНК из 200 мг муки каждого образца проводили по адаптированному ранее протоколу (Orina et al., 2018). Из мицелия коллекционных штаммов грибов *Fusarium* и *Alternaria* выделяли ДНК согласно общепринятой методике с помощью 2% раствора цетилтриметиламмоний бромида и хлороформа. Все использованные в исследовании референсные штаммы грибов идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов и хранятся в коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР (табл. 2).

Концентрацию ДНК, выделенной из мицелия грибов, измеряли с использованием набора Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (0–100 ng), ДНК из зерновой муки – Quant-iT dsDNA BS Assay Kit (0–1000 ng) на флуорометре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). ДНК штаммов грибов

разводили деионизированной водой до концентрации 10 нг/мкл и использовали в качестве стандартов для построения калибровочных кривых при проведении кПЦР. Концентрацию ДНК, выделенной из зерновой муки, выравняли до 30–80 нг/мкл в каждом образце.

Анализ содержания ДНК грибов

Содержание ДНК видов *Fusarium*, способных продуцировать трихотеценовые микотоксины (*Tri-Fusarium*) и ДНК видов *Fusarium*, продуцирующих фумонизины (*Fum-Fusarium*) оценивали методом кПЦР с пробами TaqMan. Реакции проводили в объеме 20 мкл, содержащем 10 мкл мастер-микса 2×TaqAB (АлкорБио, Россия), по 300 нМ каждого праймера, 100 нМ флуоресцентного зонда (АлкорБио, Россия) и 2 мкл раствора ДНК. Содержание ДНК грибов секций *Alternaria* и *Infectoriae* рода *Alternaria* выявляли методом кПЦР с красителем SYBR Green. Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 4 мкл мастер-микса 5×qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), по 500 нМ каждого праймера и 2 мкл раствора ДНК. Последовательности праймеров и протоколы амплификации приведены в таблице 3. Реакции проводили на термоциклере CFX96 Real-Time System (BioRad, США) минимум в двух повторностях. Среднее и стандартные ошибки рассчитывали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6. В каждом образце оценивали долю ДНК грибов к общей ДНК (пг/нг). Нижний достоверный предел выявления содержания ДНК грибов в пробе общей ДНК из образца муки установлен на уровне 5×10^{-4} пг/нг.

Таблица 1. Образцы зерна озимой пшеницы, выращенной в Краснодарском крае в 2023 г.**Table 1.** Grain samples of winter wheat grown in Krasnodarskiy Krai in 2023

№ п/п	Район	Сорт пшеницы	Назначение партии зерна	##	Disctrict	Wheat variety	Grain batch purpose
1	Белоглинский	Безостая 100	Товарное	1	Beloglinskiy	Bezostaya 100	Food / feed
2		Маркиз	Семенное	2		Seed	
3		Классика	Товарное	3		Food / feed	
4		Стиль	Товарное	4		Food / feed	
5		Гром	Товарное	5		Food / feed	
6		Школа	Товарное	6		Food / feed	
7		Стиль	Товарное	7		Food / feed	
8		Школа	Товарное	8		Food / feed	
9		Стиль	Товарное	9		Food / feed	
10		Степь	Товарное	10		Food / feed	
11		Ахмат	Товарное	11		Food / feed	
12		Таня	Товарное	12		Food / feed	
13		Васса	Семенное	13		Seed	
14		Гром	Семенное	14		Seed	
15		Стиль	Семенное	15		Seed	
16	Динской	Ахмат	Товарное	16	Dinskoy	Akhmat	Food / feed
17	Калининский	Таня	Товарное	17	Kalininskiy	Tanya	Food / feed
18		Ахмат	Товарное	18		Akhmat	Food / feed
19		неизв.	Товарное	19		unknown	Food / feed
20		неизв.	Товарное	20		unknown	Food / feed
21	Каневской	сортосмесь	Товарное	21	Kanevskoy	variety mix	Food / feed
22		Гром	Товарное	22		Grom	Food / feed
23	Кореновский	Юка	Товарное	23	Korenovskiy	Yuka	Food / feed
24		Ахмат	Товарное	24		Akhmat	Food / feed
25		неизв.	Товарное	25		unknown	Food / feed
26	Красноармейский	Стан	Товарное	26	Krasnoarmeyskiy	Stan	Food / feed
27	Тбилисский	Алексеич	Товарное	27	Tbilisskiy	Alekseich	Food / feed
28		Федор	Семенное	28		Fedor	Seed
29		Классика	Семенное	29		Classika	Seed
30		сортосмесь	Семенное	30		variety mix	Seed
31		Безостая-100	Товарное	31		Bezostaya-100	Food / feed
32		Таня	Товарное	32		Tanya	Food / feed
33		Стиль-18	Товарное	33		Stil-18	Food / feed
34	Успенский	неизв.	Семенное	34	Uspenskiy	unknown	Seed

Таблица 2. Штаммы грибов *Alternaria* и *Fusarium*, использованные в исследованиях

Вид	Штамм	Происхождение	Растение-хозяин, субстрат	Год выделения
<i>F. graminearum</i> (Tri- <i>Fusarium</i> *)	MFG 58746	Беларусь	рожь, зерно	2009
<i>F. verticillioides</i> (Fum- <i>Fusarium</i>)	MFG 59009	Грузия	кукуруза, зерно	2016
<i>A. tenuissima</i> (секц. <i>Alternaria</i>)	MFP 556101	Россия, Астраханская обл.	томат, лист	2008
<i>Alternaria</i> sp. (секц. <i>Infectoriae</i>)	MFP 094161	Россия, Ленинградская обл.	пшеница, зерно	2006

* Tri-*Fusarium* и Fum-*Fusarium* – группы видов грибов *Fusarium*, продуцирующих трихотеценовые микотоксины или фумонизины соответственно.

Table 2. *Alternaria* and *Fusarium* strains used in the study

Species	Strain	Origin	Host, substrate	Year
<i>F. graminearum</i> (Tri- <i>Fusarium</i> *)	MFG 58746	Belarus	rye, grain	2009
<i>F. verticillioides</i> (Fum- <i>Fusarium</i>)	MFG 59009	Georgia	corn, grain	2016
<i>A. tenuissima</i> (sect. <i>Alternaria</i>)	MFP 556101	Russia, Astrakhan Oblast	tomato, leaf	2008
<i>Alternaria</i> sp. (sect. <i>Infectoriae</i>)	MFP 094161	Russia, Leningrad Oblast	wheat, grain	2006

* Tri-*Fusarium* & Fum-*Fusarium* – species groups of the *Fusarium* fungi producing trichothecene mycotoxins and fumosinins, respectively.

Таблица 3. Праймеры, зонды и протоколы количественной ПЦР, использованные в работе

Целевой объект*	Праймеры и зонды	Нуклеотидные последовательности (5' → 3')	Схема ПЦР	Литературный источник
Tri- <i>Fusarium</i>	TMTri,f TMTri,r TMTri,p	CAGCAGMTRCTCAAGGTAGACCC AACTGTAYACRACCATGCCAAC Cy5-AGCTTGGTGTGGGATCTGTCCTTACCG-BHQ2	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Halstensen et al., 2006
Fum- <i>Fusarium</i>	fum1_fw fum1_rev fum1_probe	ATGCAAGAGGCGAGGCAA GGCTCTCAGAGCTTGGCAT Cy5-CAATGCCATCTTCTTCAAACCT-BHQ2	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 58° - 45 с]×40	Preiser et al., 2015
<i>Alternaria</i> секц. <i>Alternaria</i>	AAF2 AAR3	TGCAATCAGCGTCAGTAACAAA ATGGATGCTAGACCTTTGCTGAT	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 67° - 60 с; 72° - 5 с]×40	Konstantinova et al., 2002, Orina et al., 2021
<i>Alternaria</i> секц. <i>Infectoriae</i>	AinfF3 AinfR4	CTCGATGTCCGCCTCAGTAG GAGGATAGCACGGCTGGTAG	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 67° - 60 с; 72° - 3 с]×40	Gannibal et al., 2007; Orina et al., 2021

* см. примечание к таблице 2.

Table 3. Primers, probes and PCR protocols used in the study

Target*	Primers and probes	Nucleotide sequences (5' → 3')	PCR protocol	Reference
Tri- <i>Fusarium</i>	TMTri,f TMTri,r TMTri,p	CAGCAGMTRCTCAAGGTAGACCC AACTGTAYACRACCATGCCAAC Cy5-AGCTTGGTGTGGGATCTGTCCTTACCG-BHQ2	95° - 3 min; [95° - 15 sec; 60° - 60 sec]×40	Halstensen et al., 2006
Fum- <i>Fusarium</i>	fum1_fw fum1_rev fum1_probe	ATGCAAGAGGCGAGGCAA GGCTCTCAGAGCTTGGCAT Cy5-CAATGCCATCTTCTTCAAACCT-BHQ2	95° - 3 min; [95° - 15 sec; 58° - 45 sec]×40	Preiser et al., 2015
<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i>	AAF2 AAR3	TGCAATCAGCGTCAGTAACAAA ATGGATGCTAGACCTTTGCTGAT	50° - 2 min; 95° - 10 min; [95° - 15 sec; 67° - 60 sec; 72° - 5 sec]×40	Konstantinova et al., 2002, Orina et al., 2021
<i>Alternaria</i> sect. <i>Infectoriae</i>	AinfF3 AinfR4	CTCGATGTCCGCCTCAGTAG GAGGATAGCACGGCTGGTAG	50° - 2 min; 95° - 10 min; [95° - 15 sec; 67° - 60 sec; 72° - 3 sec]×40	Gannibal et al., 2007; Orina et al., 2021

* see the Table 2 footnote.

Анализ содержания микотоксинов

Экстракцию проводили из 5 г зерновой муки путем добавления 20 мл экстракционного растворителя (ацетонитрил/вода/уксусная кислота, 79:20:1, об/об/об) и перемешивания на ротационной шейкере ПСУ-20 (Biosan, Латвия) за 90 мин. Затем экстракты центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин (Polysom CLn-16, Россия). По 500 мкл каждого экстракта без какой-либо очистки переносили в стеклянные флаконы и добавляли 500 мкл раствора ацетонитрил: вода: уксусная кислота 20:79:1. Затем флаконы герметично закрывали и встряхивали в течение 30 с на Vortex Genius3 (ИКА, Германия). Для анализа отбирали по 5 мкл каждого раствора экстракта автосамплером Agilent (Agilent Technologies, Германия). Детекцию и количественное определение микотоксинов проводили на системе AB SCIEX Triple Quad™ 5500MS/MS (Applied Biosystems, США), оснащенной источником электрораспылительной ионизации TurboV и системой ВЭЖХ серии 1290 (Agilent Technologies, Германия). Хроматографическое разделение проводили при 25 °С на колонке Gemini C18, 150×4.6 мм (Phenomenex, США). В экстрактах анализировали содержание 36 микотоксинов: дезоксиниваленол (ДОН), 3-ацетил-дезоксиниваленол (3-АцДОН), 15-ацетил-дезоксиниваленол (15-АцДОН), дезоксиниваленол-3-глюкозид (ДОН-3-гл), ниваленол (НИВ), фузаренон-Х, зеараленон (ЗЕН), α-зеараленол, β-зеараленол, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 триол, диацетоксисцирпенол (ДАС),

неосоланиол (НЕО), монилиформин (МОН), фумонизин В1, фумонизин В2, фумонизин В3, боверицин (БОВ), альтернариол (АОЛ), альтернариола метиловый эфир (АМЭ), тентоксин (ТЕН), тенуазоновая кислота (ТК), афлатоксин В1, афлатоксин В2, афлатоксин G1, афлатоксин G2, охра-токсин А, охра-токсин В, стеригматоцистин (СТЕ), мико-феноловая кислота, цитринин, пенициллиновая кислота, рокфортин С, патулин, циклопиазоновая кислота.

Валидацию методики для изучения восстановления аналитов при анализе зерна пшеницы и количественный анализ содержания микотоксинов проводили согласно общепринятым руководствам (Malachová et al., 2014; ГОСТ 34140-2017). Для количественного определения микотоксинов в зерне применялись методы калибровки, соответствующие матрице, с использованием стандартных растворов микотоксинов (Romer Labs, Австрия). Предел обнаружения (LOD) для анализируемых микотоксинов устанавливался путем 20 измерений каждой чистой матрицы и расчета среднего значения. Предел количественного определения (LOQ) для анализируемых микотоксинов определялся путем добавления каждого анализируемого микотоксина к чистой матрице. Когда значение S/N (сигнал-шум) 20 параллельных измерений было выше пяти, а воспроизводимость была выше 80%, устанавливался LOQ для каждой матрицы. Показатели LOD и LOQ для выявленных микотоксинов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Восстановление аналита, предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) для выявленных микотоксинов в зерне озимой пшеницы

Аналит	Восстановление аналита, %	LOD, мкг/кг	LOQ, мкг/кг
Дезоксиниваленол	110	5.00	5.67
3-ацетил-дезоксиниваленол	90	9.56	11.45
15-ацетил-дезоксиниваленол	86	26.00	33.80
Дезоксиниваленол-3-глюкозид	80	5.20	5.67
Ниваленол	85	5.20	5.67
Зеараленон	89	0.56	1.08
T-2 токсин	76	2.52	3.50
HT-2 токсин	80	3.00	3.50
T-2 триол	80	4.95	5.30
Неосоланиол	80	4.50	5.67
Монилиформин	92	5.00	5.78
Боверицин	90	0.30	0.34
Альтернариол	85	0.79	0.98
Метиловый эфир альтернариола	85	0.69	0.98
Тентоксин	86	0.79	0.98
Тенуазоновая кислота	79	6.30	11.31
Стеригматоцистин	91	0.38	0.57

Статистический анализ

В программе Microsoft Excel 2010 рассчитывали средние значения и доверительные интервалы. В программе STATISTICA 10.0 оценивали связи между количественными

Table 4. Analyte recovery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for detected mycotoxins in winter wheat grain

Analyte	Analyte recovery, %	LOD, µg/kg	LOQ, µg/kg
Deoxynivalenol	110	5.00	5.67
3-acetyl-deoxynivalenol	90	9.56	11.45
15-acetyl-deoxynivalenol	86	26.00	33.80
Deoxynivalenol-3-glucoside	80	5.20	5.67
Nivalenol	85	5.20	5.67
Zearalenone	89	0.56	1.08
T-2 toxin	76	2.52	3.50
HT-2 toxin	80	3.00	3.50
T-2 triol	80	4.95	5.30
Neosolaniol	80	4.50	5.67
Moniliformin	92	5.00	5.78
Beauvericin	90	0.30	0.34
Alternariol	85	0.79	0.98
Alternariol monomethyl ether	85	0.69	0.98
Tentoxin	86	0.79	0.98
Tenuazonic acid	79	6.30	11.31
Sterigmatocystin	91	0.38	0.57

признаками с использованием линейного коэффициента корреляции Пирсона (r), а также оценивали влияние конкретного фактора на анализированные показатели с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты

Количество ДНК грибов *Fusarium* и *Alternaria* в зерне

Методом кПЦР выявлено присутствие ДНК Tri-*Fusarium* в зерне 100% анализированных образцов в количестве $(28008 \pm 7228) \times 10^{-4}$ пг/нг в среднем. В образцах зерна из Динского, Калининского и Тбилисского районов

выявлены наиболее высокие значения количества ДНК этой группы грибов, тогда как в зерне образцов из Белоглинского района количество ДНК Tri-*Fusarium* было в среднем в 2.0–8.5 раз достоверно ниже, чем в образцах из других районов (табл. 5).

Таблица 5. Содержание ДНК грибов *Fusarium* и *Alternaria* в зерне озимой пшеницы

Район (число образцов)	Количество ДНК грибов $\times 10^{-4}$ в среднем* (мин – макс), пг/нг			
	Tri- <i>Fusarium</i>	Fum- <i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i> секц. <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> секц. <i>Infectoriae</i>
Белоглинский (15)	10566±2172 (2439–30287)	1436±493 (0–5538)	11851±1062 (6368–19608)	33071±3311 (18190–68137)
Динской (1)	90152	0	13384	13763
Калининский (4)	34205±20325 (3368–95431)	2308±2262 (0–9232)	16468± 6897 (5723–36296)	18953±4221 (9661–30515)
Каневской (2)	13725; 31229	0; 0	26204; 27560	32507; 48208
Кореновский (3)	21389±7981 (11774–37583)	354±347 (0–1063)	18091± 8267 (5487–34106)	13991±2797 (8291–17125)
Красноармейский (1)	23299	0	32398	39541
Тбилисский (7)	55856±30179 (6163–235372)	39±39 (0–275)	16879± 2856 (9091–31356)	30097±3383 (21185–46328)
Успенский (1)	43407	273	10806	18498

*в таблице приведены средние значения с доверительным интервалом при уровне значимости 95%.

Table 5. The content of *Fusarium* and *Alternaria* DNA in the grain samples of winter wheat

District (number of samples)	Amount of fungal DNA $\times 10^{-4}$ on average* (min – max), pg/ng			
	Tri- <i>Fusarium</i>	Fum- <i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> sect. <i>Infectoriae</i>
Beloglinskiy (15)	10566±2172 (2439–30287)	1436±493 (0–5538)	11851±1062 (6368–19608)	33071±3311 (18190–68137)
Dinskoy (1)	90152	0	13384	13763
Kalininskiy (4)	34205±20325 (3368–95431)	2308±2262 (0–9232)	16468± 6897 (5723–36296)	18953±4221 (9661–30515)
Kanevskoy (2)	13725; 31229	0; 0	26204; 27560	32507; 48208
Korenovskiy (3)	21389±7981 (11774–37583)	354±347 (0–1063)	18091± 8267 (5487–34106)	13991±2797 (8291–17125)
Krasnoarmeyskiy (1)	23299	0	32398	39541
Tbilisskiy (7)	55856±30179 (6163–235372)	39±39 (0–275)	16879± 2856 (9091–31356)	30097±3383 (21185–46328)
Uspenskiy (1)	43407	273	10806	18498

*average values are accompanied with confidence interval at 95% significance level.

Доля образцов, заражённых *Fum-Fusarium*, была значительно ниже – 35%, а количество ДНК этих грибов в зерне в среднем составило $(2698 \pm 778) \times 10^{-4}$ пг/нг, что оказалось в 10 раз меньше, чем ДНК *Tri-Fusarium*. В образцах зерна из Динского, Каневского и Красноармейского районов ДНК *Fum-Fusarium* не обнаружена.

Также в зерне всех образцов выявлена ДНК грибов *Alternaria*: содержание ДНК *Alternaria* секц. *Alternaria* в среднем составило $(36296 \pm 1443) \times 10^{-4}$ пг/нг, а ДНК *Alternaria* секц. *Infectoriae* – $(68137 \pm 2137) \times 10^{-4}$ пг/нг. Выявлено достоверное влияние фактора «район отбора образцов» ($p=0.0013$) на количество ДНК *Alternaria* секц. *Infectoriae*: в образцах зерна из Белоглинского, Тбилисского и Успенского районов среднее количество ДНК грибов

из этой секции оказалось в 1.7–2.8 раз выше, чем количество ДНК *Alternaria* секц. *Alternaria*.

Группы образцов семенного и товарного назначения в среднем не различались по количеству ДНК грибов *Fusarium* и *Alternaria*.

Количество микотоксинов в зерне

В зерне всех проанализированных образцов выявлены микотоксины грибов *Fusarium* и *Alternaria*, однако их число и количество значительно варьировали (рис. 1, табл. 6). Каждый из образцов был загрязнён не менее чем тремя вторичными метаболитами грибов. Большинство образцов (58%) содержали в зерне 5–7 микотоксинов, а их максимальное разнообразие (11) выявлено в образце пшеницы с Юка из Кореновского района.

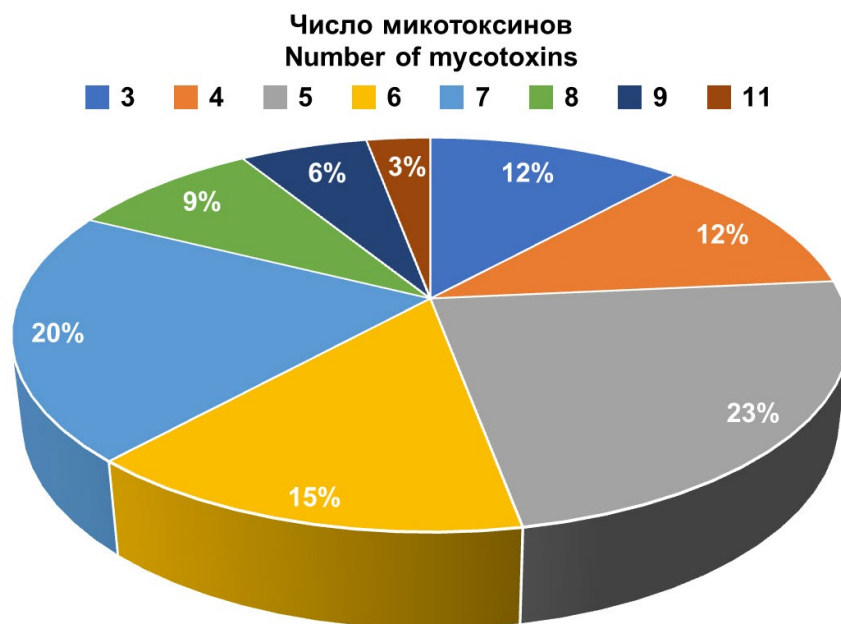


Рисунок 1. Распределение образцов озимой пшеницы по числу микотоксинов, обнаруженных в зерне

Figure. 1. Distribution of grain samples of winter wheat by the number of detected mycotoxins

Таблица 6. Содержание микотоксинов в зерне озимой пшеницы

Микотоксин	Доля загрязнённых образцов, %	Выявленное количество (мин – макс), мкг/кг
Дезоксиниваленол	79%	5.0–2038.6
3-ацетил-дезоксиниваленол	3%	50.9
15-ацетил-дезоксиниваленол	6%	28.5; 49.5
Дезоксиниваленол-3-глюкозид	50%	20.1–267.5
Ниваленол	12%	7.2–47.8
Зеараленон	9%	3.7–4.9
T-2 токсин	6%	5.4; 16.0
HT-2 токсин	47%	8.3–288.5
T-2 триол	3%	8.5
Неосоланиол	18%	3.7–7.3
Монилиформин	6%	9.5; 15.7
Боверицин	79%	0.4–4.1
Альтернариол	82%	1.3–55.4
Метилловый эфир альтернариола	29%	1.1–3.9
Тентоксин	100%	1.8–44.8
Тенуазоновая кислота	74%	22.8–490.6
Стеригматоцистин	3%	9.4

Table 6. The content of mycotoxins in the grain of winter wheat

Mycotoxin	Quote of contaminated samples, %	Revealed amount (min – max), µg/kg
Deoxynivalenol	79%	5.0–2038.6
3-acetyl-deoxynivalenol	3%	50.9
15-acetyl-deoxynivalenol	6%	28.5; 49.5
Deoxynivalenol-3-glucoside	50%	20.1–267.5
Nivalenol	12%	7.2–47.8
Zearalenone	9%	3.7–4.9
T-2 toxin	6%	5.4; 16.0
HT-2 toxin	47%	8.3–288.5
T-2 triol	3%	8.5
Neosolaniol	18%	3.7–7.3
Moniliformin	6%	9.5; 15.7
Beauvericin	79%	0.4–4.1
Alternariol	82%	1.3–55.4
Alternariol monomethyl ether	29%	1.1–3.9
Tentoxin	100%	1.8–44.8
Tenuazonic acid	74%	22.8–490.6
Sterigmatocystin	3%	9.4

Из проанализированных 36 вторичных метаболитов в зерне обнаружены 17 (табл. 6). Микотоксины 3-АцДОН, 15-АцДОН, ЗЕН, Т-2 токсин, Т-2 триол, МОН и СТЕ встречались единично или редко (в одном-трёх образцах), тогда как частота встречаемости остальных доходила до 100%.

Анализ микотоксинов, продуцируемых грибами рода *Fusarium*, выявил, кроме трёх нормируемых, ещё 9 токсичных вторичных метаболитов. Чаще других в зерне встречались ДОН, ДОН-3гл, НТ-2 токсин и БОВ. В двух образцах – с. Ахмат из Динского района и с. Безостая-100 из Тбилисского района обнаружено превышение ПДК ДОН в зерне в 2 и 3 раза. Образцы зерна, полученные из Белоглинского района, можно охарактеризовать как относительно благополучные с точки зрения контаминации зерна ДОН и ДОН-3гл, по сравнению с образцами из других шести районов (табл. 7).

Превышения ПДК ЗЕН и Т-2 токсина не выявлено. Однако в двух образцах зерна с. Маркиз из Белоглинского района и с. Юка из Кореновского района суммарное содержание химически сходных соединений – Т-2 и НТ-2 токсинов составило 112 мкг/кг и 305 мкг/кг, соответственно.

Анализ микотоксинов, продуцируемых грибами рода *Alternaria*, показал не только их высокую встречаемость в зерне, но и значительные количества этих метаболитов. В 21% образцов АОЛ выявлен в количествах

10.7–55.4 мкг/кг, а в зерне с. Маркиз из Белоглинского района содержание ТК составило 490 мкг/кг.

В одном из образцов, кроме микотоксинов, продуцируемых *Fusarium* и *Alternaria*, обнаружен СТЕ – биосинтетический предшественник афлатоксинов, продуцентами которого являются грибы рода *Aspergillus* (Rank et al., 2011; Кононенко и др., 2017). Ранее сообщалось о выявлении СТЕ в 3 пробах пшеницы из Северо-Кавказского ФО урожая 2023 г. в количестве от 1 до 53 мкг/кг (Седова и др., 2024).

Выявленные взаимосвязи между анализированными показателями

Результаты корреляционного анализа показали, что существует высокая достоверная положительная связь между количеством ДНК Tri-*Fusarium* и количеством ДОН, его ацетильных производных и ДОН-3гл в сумме ($r=0.81$, $p<0.0001$), а также с количеством ЗЕН ($r=0.52$, $p=0.002$). Связи между количеством ДНК этой группы грибов и другими трихотеценовыми микотоксинами не выявлены. Также установлена высокая достоверная связь между количеством ДНК Fum-*Fusarium* и БОВ ($r=0.67$, $p<0.0001$).

Между содержанием ДНК грибов *Alternaria* и продуцируемыми ими вторичными метаболитами выявлены достоверные положительные связи между количеством ДНК *Alternaria* секц. *Alternaria* и двух альтернариотоксинов – АМЭ ($r=0.40$, $p=0.018$), а также ТЕН ($r=0.62$, $p<0.0001$).

Таблица 7. Загрязнённость основными микотоксинами грибов *Fusarium* и *Alternaria* зерна озимой пшеницы

Район (число образцов)	Количество микотоксинов*, мкг/кг							
	Дезоксинаваленол	Дезоксинаваленол-3-глюкозид	НТ-2 токсин	Боверидин	Альтернариол	Метиловый эфир альтернариола	Тентоксин	Тенуазоновая кислота
Белоглинский (15)	33.8±15.0	3.0±2.0	12.8±7.1	0.9±0.2	4.3±1.0	0.3±0.2	7.5±1.7	98.1±34.2
Динской (1)	2038.6	196.7	0	0.4	1.8	0	4.9	99.3
Калининский (4)	136.8±59.1	29.5±11.7	8.9±5.1	1.8±0.9	7.9±3.9	1.2±0.7	7.5±2.0	151.0±78.0
Каневской (2)	0; 62.9	0; 32.2	28.8; 0	0; 1.0	1.9; 55.4	0; 3.9	11.7; 3.5	307.6; 84.9
Кореновский (3)	155.9±104.2	34.0±17.3	124.7±81.0	0.6±0.4	2.4±1.4	1.0±0.9	21.6±11.4	99.0±27.3
Красноармейский (1)	63.0	59.2	0	0.9	3.0	0	21.0	85.7
Тбилисский (7)	402.4±192.4	78.8±32.3	15.8±5.7	0.7±0.2	6.0±2.5	0.4±0.2	15.1±3.7	38.4±19.1
Успенский (1)	459.1	122.5	58.2	0.5	0	0	16.0	0

*в таблице приведены средние значения с доверительным интервалом при уровне значимости 95%.

Table 7. The contamination of grain samples of winter wheat with main mycotoxins produced by *Fusarium* and *Alternaria* fungi

District (number of samples)	The amount of mycotoxins*, µg/kg							
	Deoxynivalenol	Deoxynivalenol-3-glucoside	HT-2 toxin	Beauvericin	Alternariol	Alternariol monomethyl ether	Tentoxin	Tenuazonic acid
Beloglinskiy (15)	33.8±15.0	3.0±2.0	12.8±7.1	0.9±0.2	4.3±1.0	0.3±0.2	7.5±1.7	98.1±34.2
Dinskoy (1)	2038.6	196.7	0	0.4	1.8	0	4.9	99.3
Kalininskiy (4)	136.8±59.1	29.5±11.7	8.9±5.1	1.8±0.9	7.9±3.9	1.2±0.7	7.5±2.0	151.0±78.0
Kanevskoy (2)	0; 62.9	0; 32.2	28.8; 0	0; 1.0	1.9; 55.4	0; 3.9	11.7; 3.5	307.6; 84.9
Korenovskiy (3)	155.9±104.2	34.0±17.3	124.7±81.0	0.6±0.4	2.4±1.4	1.0±0.9	21.6±11.4	99.0±27.3
Krasnoarmeyskiy (1)	63.0	59.2	0	0.9	3.0	0	21.0	85.7
Tbilisskiy (7)	402.4±192.4	78.8±32.3	15.8±5.7	0.7±0.2	6.0±2.5	0.4±0.2	15.1±3.7	38.4±19.1
Uspenskiy (1)	459.1	122.5	58.2	0.5	0	0	16.0	0

*average values are accompanied with confidence interval at 95% significance level.

Обсуждение

К основным токсинопродуцирующим видам грибов *Fusarium*, часто встречающимся на зерновых культурах, относятся как агрессивные патогены *F. graminearum* и *F. avenaceum*, так и виды, характеризующиеся как слабые патогены, сапрофиты и эндофиты: *F. cerealis*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* и др. Поэтому, как ранее было отмечено, из-за участия в инфекционном процессе множества видов грибов *Fusarium*, характеризующихся различной патогенностью и профилем образуемых вторичных метаболитов, установить порог вредоносности фузариоза зерна достаточно сложно (Гагкаева, Гаврилова, 2014).

В нашем исследовании заражённость зерна грибами *Fusarium* оценивали на основании содержания в зерне ДНК не отдельных видов грибов, а групп с общим признаком – способностью продуцировать трихотеценовые микотоксины (Tri-*Fusarium*) или фумонизины (Fum-*Fusarium*). Преимуществом такого подхода является одновременный учёт вклада в инфицированность зерна разных видов грибов, включающих не только высоко агрессивные патогены, но и те, которые не оказывают заметного вреда растению, но при этом синтезируют опасные микотоксины. Связь между количеством ДНК Tri-*Fusarium* и риском загрязнения зерна трихотеценовыми микотоксинами, включающими не только ДОН и Т-2 токсин, была показана ранее (Gagkaeva et al. 2019; Лебедин и др., 2021).

В данном исследовании установлена ожидаемо высокая достоверная связь между количеством ДНК Tri-*Fusarium* и количеством ДОН и его производных (3-АцДОН, 15-АцДОН, ДОН-3гл), что указывает на превалирование *F. graminearum* в комплексе Tri-*Fusarium* по сравнению с другими видами. Проведённый ранее мониторинг заражённости грибами зерна, полученного из Южного ФО, выявлял доминирование *F. graminearum* на всей территории Краснодарского края, однако чаще этот патоген обнаруживали на юго-востоке региона, а также в Каневском районе (Гагкаева, Гаврилова, 2014). Регулярный анализ содержания микотоксинов в зерне пшеницы как продовольственного, так и фуражного назначения, показал, что основная доля образцов из этого региона РФ, как правило, контаминирована ДОН, и его количество в ряде случаев оказалось выше установленной ПДК (Kononenko et al., 2020; Киселева и др., 2021; Седова и др., 2024). В данном исследовании превышение ПДК ДОН выявлено в образцах зерна, полученных из Динского и Тбилисского районов центральной части Краснодарского края, которые в среднем также содержали наибольшие количества ДНК Tri-*Fusarium*.

Кроме ДОН, в образцах зерна с редкой частотой выявлены два других регламентируемых микотоксина – ЗЕН и Т-2 токсин в количествах 5–16 мкг/кг, что значительно ниже установленных ПДК. Однако, если учитывать присутствие Т-2 токсина вместе с часто встречающимся в зерне НТ-2 токсином, обладающим сходной высокой токсичностью, то в двух образцах зерна суммарное содержание этих микотоксинов превышало ПДК Т-2 токсина в 1.1–3.1 раз.

На основании ранее проведённых нами модельных экспериментов был предложен нижний критический предел (КП) обнаружения ДНК Tri-*Fusarium* в зерне

– 3955×10^{-4} пг/нг, превышение которого сигнализирует о необходимости в последующей токсикологической экспертизе образца, поскольку высока вероятность обнаружения трихотеценовых микотоксинов (Лебедин и др., 2021). В нашем исследовании 5 образцов содержали ДНК Tri-*Fusarium* в количествах, ниже рекомендованного КП, и содержание микотоксинов в них было незначительным. Среди остальных образцов, содержащих ДНК Tri-*Fusarium* выше КП, доля образцов с превышением ПДК ДОН или суммой Т-2 и НТ-2 токсинов выше 100 мкг/кг составила 14%.

Несмотря на то, что в 35% анализированных образцов обнаружена ДНК грибов, способных продуцировать ФУМ, эти микотоксины в зерне не выявлены. Группа Fum-*Fusarium* включает в себя морфологически-сходные виды комплекса FFSC, из которых на зерне пшеницы в Краснодарском крае ранее были выявлены *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* (Гагкаева и др., 2012; Горьковенко и др., 2017), *F. fujikuroi* (Жемчужина и др., 2020). Количество продуцируемых ФУМ может значительно различаться у изолятов *F. verticillioides* и *F. proliferatum* (Tancic et al., 2012; Zhou et al., 2018; Qiu et al., 2020) и во многом зависит от условий среды (Cendoya et al., 2017; Peter Mshelia et al., 2020; Deepthi et al., 2022; Dong et al., 2023). В настоящее время в РФ, выявление ФУМ в зерне пшеницы является примером нетипичной контаминации микотоксинами этой зерновой культуры, в отличие от кукурузы, в зерне которой содержание ФУМ часто достигает значений, превышающих установленную ПДК (Седова и др., 2018; Кононенко и др., 2019). Тем не менее число сообщений из разных стран об обнаружении ФУМ при проведении микотоксикологического анализа пшеницы растёт (Cendoya et al., 2018; Gagkaeva et al., 2018; Kononenko et al., 2020; Senatore et al., 2023). Кроме того показано, что между количествами ДНК *F. proliferatum* и ФУМ в зерне существует достоверная связь (Senatore et al., 2023).

Кроме ФУМ, грибы комплекса видов *F. fujikuroi* способны продуцировать ряд других микотоксинов, например, МОН и БОВ (Stepień, 2014). Среди проанализированных образцов зерна доля загрязнённых БОВ составила 79%, тогда как МОН выявлен только в двух. Выявлена достоверная положительная связь между количеством ДНК Fum-*Fusarium* и количеством БОВ в зерне. В настоящее время БОВ относят к группе остроактуальных микотоксинов, а его функции и токсический эффект находятся на стадии активного изучения (Wu et al., 2018; Hasuda, Bracarense, 2024).

Выявление заражённости образцов зерна грибами *Alternaria* также проводили на основании содержания в зерне ДНК не отдельных видов грибов, а групп, включающих представителей двух секций – *Alternaria* и *Infectoriae*. Эти грибы наиболее обильно представлены в микобиоте семян культурных и диких злаков (Ганнибал 2018; Poursafar et al., 2018; Somma et al., 2019; Sun et al., 2023), тогда как виды других секций – *Chalastospora*, *Panax*, *Pseudoalternaria* и *Ulocladioides*, – которые могут присутствовать в том же субстрате, встречаются спорадически и менее представлены (Poursafar et al., 2018; Masiello et al., 2022; Gannibal et al., 2022). Ранее показано, что в зерне из Краснодарского края встречаются виды *A. tenuissima*,

реже *A. alternata* и *A. arborescens*, относящиеся к секц. *Alternaria*, и представители секц. *Infectoriae* (Гагкаева и др., 2012; Ганнибал, 2018).

В одном из недавних исследований было установлено, что пшеница из Южного ФО контаминирована микотоксинами *Alternaria* в меньшей степени, чем образцы из других ФО: в образцах зерна из Краснодарского края урожая 2018 г. выявлен только ТЕН (в 13 % образцов), а АОЛ, АМЭ и ТК не обнаружены (Киселёва и др., 2021). Результаты нашего исследования показывают не только повсеместную встречаемость грибов *Alternaria* секций *Alternaria* и *Infectoriae* в зерне озимой пшеницы, выращенной на территории края, но и высокую частоту загрязнения образцов всеми четырьмя анализированными микотоксинами АОЛ, АМЭ, ТЕН и ТК, продуцируемыми этими грибами. Выявленное количество ДНК грибов *Alternaria* секц. *Alternaria* было в среднем в 1.9 раз ниже, чем ДНК грибов *Alternaria* секц. *Infectoriae*, что контрастирует с ситуацией в Уральском регионе и Западной Сибири, где доминировали представители секц. *Alternaria* (Орина и др., 2020, 2021).

Выявлена высокая достоверная положительная связь между содержанием ДНК грибов *Alternaria* секц. *Alternaria* и двух микотоксинов – АМЭ и ТЕН. Ранее нами уже были продемонстрированы связи между количеством ДНК *Alternaria* секц. *Infectoriae* и количеством ТЕН (Орина и др., 2020), а также ДНК *Alternaria* секц. *Alternaria* и ТК (Орина и др., 2021). Известно, что представители

разных видов из обеих секций *Alternaria* способны продуцировать анализированные вторичные метаболиты (Oviedo et al., 2013; Tralamazza et al., 2018; Masiello et al., 2020; Gannibal et al., 2022). Между тем, в ряде исследованиях показано, что в условиях чистой культуры представители секц. *Infectoriae* в среднем продуцируют в 8–95 раз меньше АОЛ, чем грибы из секц. *Alternaria* (Kahl et al., 2015; Gannibal et al., 2022), однако токсинопродуцирующая способность индивидуальных штаммов может значительно варьировать и существенно зависит от факторов среды (Tralamazza et al., 2018; Masiello et al., 2020; Gannibal et al., 2022).

Несмотря на отсутствие регламентации допустимого содержания микотоксинов грибов *Alternaria* в сельскохозяйственной продукции на территории РФ, на территории Европейского Союза существует проект рекомендаций, устанавливающий безопасные уровни содержания АОЛ, АМЭ и ТК в пищевых продуктах для детей на основе злаков – не выше 5, 5 и 500 мкг/кг, соответственно (Food Chemistry Institute, 2020). Низкие уровни допустимого содержания АОЛ и АМЭ обусловлены генотоксичностью и тератогенной активностью этих соединений (EFSA, 2016; Chen et al., 2021). По нашим данным, 29% образцов зерна из Краснодарского края урожая 2023 г. содержали АОЛ в количествах, превышающих рекомендованный уровень в 1.3–11 раз.

Заключение

В зерне пшеницы, выращенной в Краснодарском крае в 2023 г., с помощью высокоточных аналитических методов – кПЦР и ВЭЖХ-МС/МС, выявлено повсеместное присутствие грибов *Fusarium* и *Alternaria* и продуцируемых ими микотоксинов.

Установлена достоверная положительная связь между количествами ДНК *Tri-Fusarium* и ДОН, а также ЗЕН, что указывает на доминирование *F. graminearum* среди возбудителей фузариоза зерна в этом регионе. В 6% образцов выявлено превышение ПДК ДОН. В наиболее представительной в исследовании выборке образцов зерна из Белоглинского района, содержание ДНК *Tri-Fusarium* и ДОН было ниже, по сравнению с образцами из других семи районов Краснодарского края.

Благодарности

Авторы благодарят специалиста региональной группы маркетинга по Северному Кавказу и ЮФО фирмы «Август»

Клепцову Е.В. за предоставленные для исследований образцы зерна и к.б.н. Гагкаеву Т.Ю. (ВИЗР) за ценные замечания при подготовке рукописи.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 19-76-30005).

Библиографический список (References)

- Аксенов ИВ, Седова ИБ, Чалый ЗА, Тутельян ВА (2023) Альтернативные токсины как фактор риска для здоровья населения. *Анализ риска здоровью* (4):146–157. <http://doi.org/10.21668/health.risk/2023.4.14>
- Гаврилова ОП, Гагкаева ТЮ (2020) Новые сведения о распространении на территории России гриба *Fusarium langsethiae*, продуцирующего Т-2 и НТ-2 токсины. *Вестник защиты растений* 103(3):201–206. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-13282>
- Гагкаева ТЮ, Гаврилова ОП (2014) Зараженность зерна грибами *Fusarium* в Краснодарском и Ставропольском краях. *Защита и карантин растений* (3):30–33
- Гагкаева ТЮ, Гаврилова ОП, Орина АС, Казарцев ИА и др (2017) Сравнение методов выявления в зерне токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium*. *Микология и фитопатология* 51(5):292–298
- Гагкаева ТЮ, Ганнибал ФБ, Гаврилова ОП (2012) Зараженность зерна пшеницы грибами *Fusarium* и *Alternaria*

- на юге России в 2010 году. *Защита и карантин растений* (1):37–41
- Ганнибал ФБ (2018) Изучение факторов, влияющих на развитие альтернариоза зерна у злаков, возделываемых в европейской части России. *Сельскохозяйственная биология* 53(3):605–615. <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.605rus>
- Горьковенко ВС, Бондаренко ИИ, Соловьева АЮ (2017) Фузариозная инфекция в зернотравянопропашном севообороте в Краснодарском крае. Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов. Материалы VIII международной научно-практической конференции, посвящается 95-летию Кубанского государственного аграрного университета. 110–114
- ГОСТ 34140-2017. Продукты пищевые, корма, продовольственное сырьё. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (2017) М.: Стандартинформ
- Дробин ЮД, Солдатенко НА, Сухих ЕА, Коваленко АВ (2015) Итоги мониторинга контаминации фуражного зерна пшеницы, ячменя и кукурузы на юге России. *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии* 4(16):27–30
- Жалиева ЛД (2010) Грибы рода *Fusarium* в агроценозе озимой пшеницы в условиях Краснодарского края. *Иммунопатология, аллергология, инфектология* (1):101
- Жемчужина НС, Киселева МИ, Александрова АВ, Коломиец ТМ (2020) Микромицеты на озимой пшенице в Краснодарском крае и Ростовской области. *Защита и карантин растений* (6):22–26
- Каракотов СД, Аршава НВ, Башкатова МБ (2019) Мониторинг и контроль заболеваний пшеницы в Южном Зауралье. *Защита и карантин растений* (7):18–25
- Киселева МГ, Седова ИБ, Чалый ЗА, Захарова ЛП и др. (2021) Анализ продовольственного зерна в Российской Федерации на загрязненность широким спектром микотоксинов (на примере урожая 2018 года). *Сельскохозяйственная биология* 56(3):559–577. <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.559rus>
- Конonenко ГП, Пирязева ЕА, Зотова ЕВ, Буркин АА (2017) Видовой состав и токсикологическая характеристика грибов рода *Aspergillus*, выделенных из грубых кормов. *Сельскохозяйственная биология* 52(6):1279–1286. <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1279rus>
- Конonenко ГП, Буркин АА, Зотова ЕВ, Смирнов АМ (2019) Микотоксикологическое исследование кормового зерна кукурузы (1998–2018 гг.). *Российская сельскохозяйственная наука* (3):28–31. <http://doi.org/10.31857/S2500-26272019328-31>
- Лебедин ЮС, Орина АС, Гаврилова ОП, Гагкаева ТЮ и др. (2021) Применение аналитических методов для выявления критических пределов инфицирования зерна грибами рода *Fusarium*. *Аграрная наука* 344(1):52–60. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-52-60>
- Мустафина МА, Таракановский АН (2018) Защита от фузариоза колоса – определяющий фактор качества зерна. *Защита и карантин растений* (5):14–16
- Орина АС, Гаврилова ОП, Гагкаева ТЮ, Ганнибал ФБ (2020) Микромицеты *Alternaria* spp. и *Bipolaris sorokiniana* и микотоксины в зерне, выращенном в Уральском федеральном округе. *Микология и фитопатология* 54(5):365–377. <http://doi.org/10.31857/S0026364820050086>
- Орина АС, Гаврилова ОП, Гагкаева ТЮ, Гогина НН (2021) Контаминация зерна из Западной Сибири грибами *Alternaria* и их микотоксинами. *Вестник защиты растений* 104(3):153–162. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-3-15019>
- Седова ИБ, Захарова ЛП, Киселева МГ, Чалый ЗА и др. (2021) Дезоксиниваленол как фактор риска загрязнения продовольственного зерна: мониторинг урожаев 1989–2018 гг. в Российской Федерации. *Анализ риска здоровью* (3):85–98. <http://doi.org/10.21668/health.risk/2021.3.08>
- Седова ИБ, Захарова ЛП, Киселева МГ, Чалый ЗА и др. (2018) Фузариотоксины и афлатоксин В1 в продовольственном зерне кукурузы в Российской Федерации. *Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия* 21:129–137
- Седова ИБ, Чалый ЗА, Спиридонова АЛ, Иванова УВ и др. (2024) Микотоксины в продовольственном зерне отечественного производства урожая 2023 г. Анализ риска здоровью – 2024. Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. В 2-х томах. Пермь. 359–363
- Технический регламент Таможенного союза 015/2011 «О безопасности зерна» с изменениями на 15 сентября 2017 г. Приложение № 2
- Технический регламент Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» с изменениями от 8 августа 2019 г. Приложение № 3
- Федеральная служба государственной статистики. 2024 (электронные версии). <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (04.09.2024)
- Шипилова НП, Гаврилова ОП, Гагкаева ТЮ (2014) Влияние зараженности грибами *Fusarium* рода на качественные характеристики зерна озимой пшеницы. *Вестник защиты растений* (4):27–31
- Cendoya E, Pinson-Gadais L, Farnochi MC, Ramirez ML et al (2017) Abiotic conditions leading to FUM gene expression and fumonisin accumulation by *Fusarium proliferatum* strains grown on a wheat-based substrate. *Int J Food Microbiol* 253:12–19. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.017>
- Cendoya E, Chiotta ML, Zchetti V, Chulze SN et al (2018) Fumonisin and fumonisin-producing *Fusarium* occurrence in wheat and wheat by-products. A review. *J Cereal Sci* 80:158–166. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.010>
- Chen A, Mao X, Sun Q, Wei Z et al (2021) *Alternaria* mycotoxins: an overview of toxicity, metabolism, and analysis in food. *J Agric Food Chem* 69(28):7817–7830. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03007>
- Deepthi BV, Deepa N, Vanitha PR, Sreenivasa MY (2022) Stress responses on the growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium proliferatum* associated with stored poultry feeds. *AFS* 2:100091. <http://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100091>
- Dong T, Qiao S, Xu J, Shi J et al (2023) Effect of abiotic conditions on growth, mycotoxin production, and gene expression by *Fusarium fujikuroi* species complex strains from maize. *Toxins* 15(4):260. <http://doi.org/10.3390/toxins15040260>

- EFSA (2016) Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA J* 14: e04654
- Food Chemistry Institute of the Association of the German Confectionery Industry (2020) *Alternaria* toxins: occurrence, toxicity, analytical methods, maximum levels. *Sweet Vision* 67(1):6–7
- Gagkaeva T, Gavrilova O, Orina A, Lebedin Y et al (2019) Analysis of toxigenic *Fusarium* species associated with wheat grain from three regions of Russia: Volga, Ural, and West Siberia. *Toxins* 11(5):252. <https://doi.org/10.3390/toxins11050252>
- Gagkaeva TYu, Orina AS, Gavrilova OP, Ablova IB et al (2018) Characterization of resistance of winter wheat varieties to Fusarium head blight. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 22(6):685–692. <http://doi.org/10.18699/VJ18.411>
- Gannibal PB, Orina AS, Kononenko GP, Burkin AA (2022) Distinction of *Alternaria* sect. *Pseudoalternaria* strains among other *Alternaria* fungi from cereals. *J Fungi* 8(5):423. <http://doi.org/10.3390/jof8050423>
- Gannibal PhB, Yli-Mattila T (2007) Morphological and UP-PCR analyses and design of a PCR assay for differentiation of *Alternaria infectoria* species-group. *Mikol Fitopatol* 41:313–322
- Halstensen AS, Nordby KC, Eduard W., Klemsdal SS (2006) Real time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *J Environ Monit* 8:1235–1241. <http://doi.org/10.1039/b609840a>
- Hasuda AL., Bracarense APFRL (2024) Toxicity of the emerging mycotoxins beauvericin and enniatins. A mini-review. *Toxicon* 239:107534. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107534>
- Kahl SM, Ulrich A., Kirichenko AA, Müller ME (2015) Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. *J Appl Microbiol* 119:1637–1650
- Konstantinova P, Bonants PJM, van Gent-Pelzer MPE, van der Zouwen P et al (2002) Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycol Res* 106:23–33. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005160>
- Kononenko GP, Burkin AA, Zotova YeV (2020) Mycotoxilogical monitoring. Part 2. Wheat, barley, oat and maize grain. *Veterinary Science Today* 2:139–145. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145>
- Kosiak B, Torp M, Skjerve E, Andersen B (2004) *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality — a matched pair sample study. *Int J Food Microbiol* 93(1):51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.006>
- Masiello M, El Ghorayeb R, Somma S, Saab C et al (2022) *Alternaria* species and related mycotoxin detection in Lebanese durum wheat grain. *Phytopathol Mediter* 61(2):383–393. <https://doi.org/10.36253/phyto-13396>
- Masiello M, Somma S, Susca A, Ghionna V et al (2020) molecular identification and mycotoxin production by *Alternaria* species occurring on durum wheat, showing black point symptoms. *Toxins* 12:275. <https://doi.org/10.3390/toxins12040275>
- Orina AS, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu (2018) Adaptation of the quantitative PCR method for the detection of the main representatives of cereal grain mycobiota. *MIR J* 5(1):78–83. <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2018-5-1-78-83>
- Orina AS, Gavrilova OP, Gogina NN, Gannibal PB et al (2021) Natural occurrence of *Alternaria* fungi and associated mycotoxins in small-grain cereals from the Urals and West Siberia regions of Russia. *Toxins* 13(10):681. <https://doi.org/10.3390/toxins13100681>
- Oviedo MS, Sturm ME, Reynoso MM, Chulze SN et al (2013) Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian J Microbiol* 44: 447–455
- Mshelia P, Selamat J, Iskandar Putra Samsudin N, Rafii MY et al (2020) Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins* 12(8):478. <https://doi.org/10.3390/toxins12080478>
- Poursafar A, Ghosta Y, Orina AS, Gannibal PB et al (2018) Taxonomic study on *Alternaria* sections *Infectoriae* and *Pseudoalternaria* associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran. *Mycol Prog* 17:343–356
- Preiser V, Goetsch D, Sulyok M, Krska R et al (2015) The development of a multiplex real-time PCR to quantify *Fusarium* DNA of trichothecene and fumonisin-producing strains in maize. *Anal Methods* 7:1358–1365
- Qiu J, Lu Y, He D, Lee YW et al (2020) *Fusarium fujikuroi* species complex associated with rice, maize, and soybean from Jiangsu Province, China: phylogenetic, pathogenic, and toxigenic analysis. *Plant Dis* 104(8):2193–2201. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1909-RE>
- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J et al (2011) Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol* 115(4–5):406–420. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.013>
- Senatore MT, Prodi A, Tini F, Balmas V et al (2023) Different diagnostic approaches for the characterization of the fungal community and *Fusarium* species complex composition of Italian durum wheat grain and correlation with secondary metabolite accumulation. *J Sci Food Agric* 103(9): 4503–4521 <https://doi.org/10.1002/jsfa.12526>
- Sharon O, Kagan-Trushina N, Sharon A (2023) Wheat fungal endophyte communities are inseparable from the host and influence plant development. *mBio* 15:e02533-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.02533-23>
- Somma S, Amatulli MT, Masiello M, Moretti A, Logrieco AF (2019) *Alternaria* species associated with wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *Int J Food Microbiol* 293:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.008>
- Stępień L (2014) The use of *Fusarium* secondary metabolite biosynthetic genes in chemotypic and phylogenetic studies. *Crit Rev Microbiol* 40(2):176–185. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770387>
- Sun X, Sharon O, Sharon A (2023) Distinct features based on partitioning of the endophytic fungi of cereals and other grasses. *Microbiol Spectr* 11:e0061123. <https://doi.org/10.1128/spectrum.0061123>
- Tancic S, Stankovic S, Levic J, Krnjaja V, Vukojević J (2012) Diversity of the *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*

- isolates according to their fumonisin B1 production potential and origin. *Genetika* 44(1):163–176. <https://doi.org/10.2298/GENSR1201163T>
- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase CHT, de Oliveira Rocha L (2018) Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Cur Opin Food Sci* 23:57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>
- Wu Q, Patocka J, Nepovimova E, Kuca K (2018) A review on the synthesis and bioactivity aspects of beauvericin, a *Fusarium* mycotoxin. *Front Pharmacol* 9:1338. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01338>
- Zhou D, Wang X, Chen G, Sun S et al (2018) The major *Fusarium* species causing maize ear and kernel rot and their toxigenicity in Chongqing, China. *Toxins* 10(2):90. <https://doi.org/10.3390/toxins10020090>

Translation of Russian References

- Aksenov IV, Sedova IB, Chalyy ZA, Tutelyan VA (2023) [*Alternaria* toxins as a risk factor for public health] *Analiz riska zdorovyu* (4):146–157 (in Russian) <http://doi.org/10.21668/health.risk/2023.4.14>
- Gavrilova OP, Gagkaeva TYu (2020) [New information on the distribution of the fungus *Fusarium langsethiae* in Russia, which produces T-2 and HT-2 toxins] *Vestnik zashchity rasteniy* 103(3):201–206 (in Russian) <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-13282>
- Gagkaeva TYu, Gavrilova OP (2014) [The contamination of grain by *Fusarium* fungi in the Krasnodar and Stavropol regions] *Zashchita i karantin rasteniy* (3):30–33 (in Russian)
- Gagkayeva TYu, Gavrilova OP, Orina AS, Kazartsev IA (2017) [Comparison of methods for identification of toxin-producing *Fusarium* fungi in the cereal grain] *Mikologiya i Fitopatologiya* 51(5):292–298 (in Russian)
- Gagkaeva TYu, Gannibal FB, Gavrilova OP (2012) [The contamination of wheat grain with *Fusarium* and *Alternaria* fungi in southern Russia in 2010] *Zashchita i karantin rasteniy* (1):37–41 (in Russian)
- Gannibal FB (2018) [Study of the factors influencing the development of *Alternaria* disease in grains cultivated in the European part of Russia.] *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* 53(3):605–615 (in Russian) <http://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.3.605rus>
- Gorkovenko VS, Bondarenko II, Soloveva AYu (2017) [*Fusarium* infection in grain forage crop rotation in the Krasnodar region] [The agrotechnical method of protecting plants from harmful organisms. Materials from the VIII International Scientific and Practical Conference dedicated to the 95th anniversary of the Kuban State Agrarian University] 110–114 (in Russian)
- GOST 34140-2017. Food products, animal feed, food raw materials. Method for determining mycotoxins using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (2017) M.: Standartinform (in Russian)
- Drobin YuD, Soldatenko NA, Suhii EA, Kovalenko AV (2015) [The results of the monitoring of contamination in feed grains such as wheat, barley, and corn in southern Russia] *Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii* 4(16):27–30 (in Russian)
- Zhalieva LD (2010) [The fungi of the genus *Fusarium* in the agrocenosis of winter wheat in the Krasnodar region] *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* (1):101 (in Russian)
- Zhemchuzhina NS, Kiseleva MI, Aleksandrova AV, Kolomiets TM (2020) [Micromycetes on winter wheat in the Krasnodar region and Rostov region] *Zashchita i karantin rasteniy* (6):22–26 (in Russian)
- Karakotov SD, Arshava NV, Bashkatova MB (2019) [Monitoring and Control of Wheat Diseases in South Ural] *Zashchita i karantin rasteniy* (7):18–25 (in Russian)
- Kiseleva MG, Sedova IB, Chalyy ZA, Zaharova LP (2021) [Analysis of food grain in the Russian Federation for contamination with a broad spectrum of mycotoxins (based on the 2018 harvest).] *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* 56(3):559–577 (in Russian) <http://doi.org/10.15389/agrobiol.2021.3.559rus>
- Kononenko GP, Piryazeva EA, Zotova EV, Burkin AA (2017) [The species composition and toxicological characteristics of *Aspergillus* fungi isolated from rough animal feeds] *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* 52(6):1279–1286 (in Russian) <http://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.6.1279rus>
- Lebedin YuS, Orina AS, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu (2021) [The application of analytical methods to identify critical thresholds for grain infection by *Fusarium* fungi] *Agrarnaya nauka* 344(1):52–60 (in Russian) <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-52-60>
- Mustafina MA, Tarakanovskiy AN (2018) [The protection against ear fusariosis is a determining factor in grain quality] *Zashchita i karantin rasteniy* (5):14–16 (in Russian)
- Orina AS, Gavrilova OP, Gagkayeva TYu, Gannibal PhB (2020) [Micromycetes *Alternaria* spp. and *Bipolaris sorokiniana* and mycotoxins in the grain from the Ural region] *Mikologiya i Fitopatologiya* 54(5):365–377 (in Russian) <http://doi.org/10.31857/S0026364820050086>
- Orina AS, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu, Gogina NN (2021) [Contamination of grain from Western Siberia by *Alternaria* fungi and their mycotoxins] *Vestnik zashchity rasteniy* 104(3):153–162 (in Russian) <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-3-15019>
- Sedova IB, Zaharova LP, Kiseleva MG, Chalyy ZA (2021) [Deoxynivalenol as a risk factor for contamination of food grains: monitoring harvests from 1989 to 2018 in the Russian Federation] *Analiz riska zdorovyyu* (3):85–98 (in Russian) <http://doi.org/10.21668/health.risk/2021.3.08>
- Sedova IB, Zaharova LP, Kiseleva MG, Chalyy ZA (2018) [Fusariotoxins and aflatoxin B1 in food corn grain in the Russian Federation] [Scientific works of the North Caucasian Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, and Winemaking] 21:129–137 (in Russian)
- Sedova IB, Chalyy ZA, Spiridonova AL, Ivanova UV (2024) [Mycotoxins in domestically produced food grain of the 2023 harvest] [Health risk assessment – 2024. Proceedings of the XIV All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation] 359–363 (in Russian)
- The Technical Regulation of the Customs Union CU 015/2011 “On Grain Safety,” with amendments as of September 15, 2017, is included in Appendix № 2 (in Russian)

The Technical Regulation of the Customs Union CU 021/2011 “On Food Safety,” with amendments dated August 8, 2019, is included in Appendix № 3 (in Russian) Federal State Statistics Service. 2024 (electronic versions). <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (04.09.2024)

Shipilova NP, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu (2014) [The influence of *Fusarium* species infection on the quality characteristics of winter wheat grain] *Vestnik zashchity rasteniy* (4):27–31 (in Russian)

Plant Protection News, 2024, 107(3), p. 108–120

OECD+WoS: 1.06+RQ (Mycology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2024-107-3-16677>

Full-text article

ANALYSIS OF FUNGAL AND MYCOTOXIN CONTAMINATION OF WINTER WHEAT GRAIN GROWN IN KRASNODARSKIY KRAI IN 2023

E.P. Arabina^{1,2}, A.S. Orina^{1*}, O.P. Gavrilova¹, N.N. Gogina³

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Information Technologies, Mechanics and Optics University, St. Petersburg, Russia

³All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Poultry, Sergiev Posad, Russia

*corresponding author, e-mail: orina-alex@yandex.ru

Using quantitative PCR (qPCR) and high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) ubiquitous presence of *Fusarium* and *Alternaria* fungi and their mycotoxins was detected in winter wheat grain grown in Krasnodarskiy Krai in 2023. All samples contained DNA of *Fusarium* producing trichothecene mycotoxins (Tri-*Fusarium*) in the range of 244–23537 pg/μg. DNA of *Fusarium* producing fumonisins was detected in 35% of grain samples at 27–923 pg/μg. All samples contained *Alternaria* sect. *Alternaria* and sect. *Infectoriae* DNA at average levels of 3630±144 and 6814±214 pg/μg, respectively. Of the 36 analyzed mycotoxins, 17 metabolites were found in the grain samples: from 3 to 11 mycotoxins in each sample. Among *Fusarium* mycotoxins, most common were deoxynivalenol (DON) (in 79% of samples), deoxynivalenol-3-glucoside (50%), HT-2 toxin (47%), and beauvericin (70%). In two samples (6% of the total), the maximum permissible DON concentration was exceeded by 2–3 times. A significant positive correlation between Tri-*Fusarium* DNA and DON content, as well as zearalenone, was found, indicating *F. graminearum* prevalence among the pathogens causing Fusarium head blight in this region. A high occurrence of mycotoxins produced by *Alternaria* fungi alternariol (82% of contaminated samples), tentoxin (TEN) (100%), and tenuazonic acid (79%) in the grain was revealed. A significant correlation between the content of *Alternaria* sect. *Alternaria* DNA and two mycotoxins alternariol monomethyl ether and TEN was found. Significant distinctions were found between different Krasnodarskiy Krai locations in grain contamination levels with *Fusarium*, *Alternaria* fungi and mycotoxins.

Keywords: fungi, DNA, *Alternaria*, *Fusarium*, quantitative PCR, mycotoxins, HPLC-MS/MS

Submitted: 05.09.2024

Accepted: 18.10.2024

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СТЕБЛЕВОГО МЕЛАНОЗА ПШЕНИЦЫ *PSEUDOMONAS CICHORII* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Е.В. Воронов¹, О.Ю. Словарева^{1*}, А.А. Десятерик^{1,2}, М.О. Кондратьев¹, А.Н. Игнатов³

¹Всероссийский центр карантина растений, Быково

²Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

³Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва

* ответственный за переписку, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Фитопатогенная бактерия *Pseudomonas cichorii* поражает широкий перечень сельскохозяйственных культур, в том числе вызывает стеблевой меланоз пшеницы – культуры стратегического значения для России. Возбудитель стеблевого меланоза регулируется импортерами российской зерновой продукции. В связи с этим, важная задача – актуализация метода идентификации *P. cichorii* на основе полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). В качестве мишени для ПЦР-РВ использован участок длиной 90 п.о. одного из известных генов патогенности *hrcRST P. cichorii*. Положительный результат ПЦР-анализа был получен для референтных штаммов *P. cichorii* и подтвержден секвенированием ДНК последовательности ампликона. Полученные нуклеотидные последовательности были сопоставлены с гомологичными фрагментами генома типового штамма DSM 50259. В результате сравнительного анализа ДНК были изменены последовательности прямого праймера и зонда. Для зонда была показана возможность применения доступной на территории РФ модификации в которой используется сочетание красителя FAM и гасителя флуоресценции BHQ. Оценку специфичности новой праймерной системы ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 проводили с использованием 107 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, включая *P. cichorii*, *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea*, *P. orientalis*. С ДНК 4-х штаммов (*P. poae*, *P. graminis* и 2 штамма *P. fluorescens*) показана неспецифичная реакция на 35–37 пороговом цикле, накопление не имело экспоненциальный вид. Аналитическая чувствительность теста позволяет обнаружить *P. cichorii* в концентрации 10¹ КОЕ/мл. Тест ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 может быть использован в качестве отборочного при обнаружении *P. cichorii* в растительной продукции и для характеристики чистых бактериальных культур.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, бактериозы зерновых культур, фитосанитарные требования, карантин растений, диагностика фитопатогенов, молекулярно-генетические методы идентификации

Поступила в редакцию: 16.08.2024

Принята к печати: 01.11.2024

Введение

Грамотрицательная гамма-протеобактерия *Pseudomonas cichorii* (далее – *Pc*) – опасный патоген, вызывающий заболевания многих сельскохозяйственных культур. Бактерия патогенна главным образом для культур семейств Сложноцветные, Мальвовые, Бобовые. Основными поражаемыми растениями являются *Apium graveolens* (сельдерей пахучий) (Surico, Iacobellis, 1978), *Chrysanthemum* (хризантема) (Janse, 1987; Osdashi, 2020), включая *Chrysanthemum morifolium* (хризантема садовая) (Rodrigues et al., 1976); *Cichorium endivia* (эндивий) (Patel et al., 2021) и его подвиды и сорта, *Cichorium intybus* (цикорий обыкновенный) (Van Outryve et al., 1989), *Gerbera* (гербера), в т.ч. *Gerbera jamesonii* (гербера Джемсона) (Miller, Knauss, 1973), *Hibiscus rosa-sinensis* (гибискус китайский) (Chase, 1986), *Vigna angularis* (адзуки) (Wood, Easdown, 1990) и *Lactuca sativa* (латук посевной) (Hikichi et al., 1996). К прочим растениям, которым может вредить патоген, относятся также представители семейств Тыквенные, Пасленовые, Яснотковые, Мятликовые и некоторых других: *Ocimum basilicum* (базилик душистый) (Miller et al., 1986), *Borago officinalis* (огуречная трава)

(Cambra et al., 2004), *Citrullus lanatus* (арбуз) (Amadi et al., 2009), *Coreopsis lanceolata* (кореопсис ланцетовидный) (Garibaldi et al., 2009), *Cucumis melo* (дыня), *Cucurbita pepo* (кабачок) (Bastas, 2013), *Duranta erecta* (дуранта ползучая) (Gumtow et al., 2013), *Glycine max* (соя) (Yu, Lee, 2012), *Luffa aegyptiaca* (люффа египетская) (Sharma, Agora, 2016), *Nicotiana tabacum* (табак), *Phlox paniculata* (флокс метельчатый) (Corryn et al., 2009), *Plumeria pudica* (плюмерия стыдливая) (Sugiyama et al., 2018), *Solanum lycopersicum* (томат) (Trantas et al., 2013), *Stevia rebaudiana* (стевия медовая) (Marque et al., 2016), *Solanum melongena* (баклажан) (Hikichi et al., 2013), *Perilla frutescens* (перилла) (Jang et al., 2023), *Triticum* (пшеница) (Piening, MacPherson, 1985) и ряд других видов.

В связи с широким перечнем поражаемых культур и многообразием вызываемых симптомов, бактериозы, вызываемые *Pc*, имеют множество названий – бактериальный ожог сельдерея (bacterial blight of celery) (Elsisi, 2019), мокрая гниль грибных пластинок (drippy gill of mushrooms) (Gill, 1994), листовая гниль перца (leaf rot of

capsicum) (Rivera et al., 1981), лаковая пятнистость латука (varnish spot of lettuce) (Grogan et al., 1977) и другие.

Как патоген зерновых культур, *Pc* впервые упомянут в 1965 г., когда бактерия была изолирована из яровой пшеницы, выращиваемой на почве с дефицитом меди в Канаде (Piening, MacPherson, 1985). В дальнейшем, сообщалось об обнаружении возбудителя на пшенице в 1974–1996 гг. в США, Новой Зеландии и Аргентине (Wilkie, Dye, 1974; Malhi et al., 1989; Perneznt et al., 1994; Alippi, 1996). Бактериоз, вызываемый *Pc* на пшенице, был назван стеблевым меланозом; симптомы заболевания появляются в фазе молочной спелости в виде мелких светло-коричневых поражений на стебле под нижними узлами (Piening,

Материалы и методы исследования

Материалами исследования являлись штаммы целевого вида *Pc* VNIИKR-B-0201, VNIИKR-B-0202, VNIИKR-B-0203 (Тешич и др., 2021) и 104 штамма родственных бактерий рода *Pseudomonas* (табл. 1).

В таблице 2 представлены характеристики используемых олигонуклеотидов.

Приведенный в публикации В. Cottyn с коллегами (2010) модифицированный олигонуклеотид (зонд) PscHrcMGB687 (5'-FAM-TTC AAG CAG GCC ATG T-MGB-NFQ3-3'), входящий в состав теста ПЦР-РВ PscHrc662F/PscHrc751R/PscHrcMGB687 на участок длиной 90 п.о. одного из генов патогенности *hrcRST* (Cottyn et al., 2010), в работе не использовали, поскольку длина зонда составляла 16 нуклеотидов, а температура отжига всего 48 °С. Указанные характеристики являются не оптимальными для зонда в случае использования его без модификации MGB (minor groove binder, торговая марка Applied Biosystems TaqMan, США), увеличивающей температуру отжига даже при низком GC-составе и небольшой длине.

Предварительный этап оценки наличия генетической мишени для праймеров PscHrc662F/PscHrc751R (Cottyn et al., 2010) у *Pc* проводили с ДНК штаммов VNIИKR-B-0201, VNIИKR-B-0202, VNIИKR-B-0203. Использовали следующий состав реакционной смеси: 16.0 мкл воды, свободной от нуклеаз, 5.0 мкл 5× qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), по 1 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль и 2.0 мкл ДНК. В качестве отрицательного контрольного образца в реакционную смесь вместо ДНК вносили деионизированную воду. Параметры ПЦР: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин., затем 35 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 40 с, 72 °С – 15 с, финальная элонгация при 72 °С – 7 мин. ПЦР проводили на амплификаторе ДТпрайм 5М6 («ДНК-Технология», Россия). Каждый штамм тестировали в трех повторах. Продукты ПЦР двух повторов визуализировали с помощью электрофореза в 2.0% агарозном геле (размер ПЦР-продукта 90 п.о.) с окраской красителем бромистый этидий и документировали при помощи системы ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США). Продукты ПЦР третьего повтора очищали с помощью «Cleanup Standard» (ЗАО «Евроген», Россия), измеряли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) и секвенировали методом Сэнгера с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Scientific, США). Обработку полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей проводили в программе Ugene 47 (Unipro UGENE

MacPherson, 1985).

Актуальность изучения *Pc* как патогена пшеницы вызвана тем, что бактерия регулируется фитосанитарными требованиями Египта, Иордании и Мексики – крупных импортеров российской зерновой продукции (Словарева, 2023). Для проведения анализа экспортируемой из РФ пшеницы на наличие *Pc* требуются надежные экспресс-тесты, которые на момент начала исследования отсутствовали, или компоненты для них не были доступны на территории РФ.

Цель исследования – разработка оригинальной праймерной системы для ПЦР анализа в режиме «реального времени» для идентификации *Pc*.

software, [сайт] URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html>).

Последовательности целевых ампликонов штаммов VNIИKR-B-0201, VNIИKR-B-0202, VNIИKR-B-0203, полученные с праймерами PscHrc662F/PscHrc751R, выравнивали в программе Ugene 47 (Unipro UGENE software, [сайт] URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html>) вместе с гомологичной последовательностью из генома типового штамма *Pc* DSM 50259 (RefSeq NZ_CP007039.1) с помощью алгоритма UGENE. Выровненные нуклеотидные последовательности использовали при редактировании последовательностей праймеров и зонда для теста PscHrc662F/PscHrc751R/PscHrcMGB687 (Cottyn et al., 2010) и при разработке теста ПЦР-РВ. Испытание разработанного теста ПЦР-РВ проводили на амплификаторе детектирующем CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь содержала: 14.9 мкл воды, свободной от нуклеаз, 5.0 мкл 5X qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), по 1.0 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль, 0.1 мкл внутреннего положительного контроля (ЗАО «Синтол», Россия), и 2.0 мкл ДНК. Параметры ПЦР: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин., затем 45 циклов: 95 °С – 15 с и 60 °С – 45 с.

Оценку способности нового теста ПЦР-РВ отличать *Pc* от других бактерий рода *Pseudomonas* проводили путем тестирования целевых и родственных штаммов, перечисленных в таблице 1.

Оценку аналитической чувствительности (наименьшего числа копий генетической мишени, детектируемых в образце) нового теста ПЦР-РВ проводили с использованием ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Pc* VNIИKR-B-0201 в концентрациях от 10¹ КОЕ/мл (низкая) до 10⁷ КОЕ/мл (высокая). В качестве матрицы для суспензий использовали стерильную воду (тестирование чистой культуры) и аналитические пробы, приготовленные из семян пшеницы по методике, оптимизированной для идентификации других бактериозов зерновых культур (Мувинги и др., 2022). Концентрацию бактерий в суспензиях определяли методом стандартных разведений и высевом на питательный агар.

Результаты проведения нового теста ПЦР-РВ оценивали как положительные при наличии специфичной реакции в виде экспоненциальной кривой флуоресценции по каналу FAM и при отсутствии специфичной реакции при тестировании отрицательных контролей, а также при наличии реакции по каналу HEX (внутренний положительный контроль) при тестировании всех образцов ДНК.

Таблица 1. Штаммы бактерий, используемые в исследовании
Table 1. Bacteria strains, used in the study

Штамм VNIKR-B [Strain VNIKR-B]*	Вид бактерии [Bacterial species]	Растение -хозяин [Host plant]
0201, 0202, 0203	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Lactuca sativa</i>
0335 (DSM 7231)	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>Oryza sativa</i>
0440 (CFBP 2216)	<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	<i>Avena sativa</i>
0204 (20M5-11), 0205 (20M5-12), 0206 (20M52-170)	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0207 (20M25-82)	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>Triticum durum</i>
0208 (20M32-116), 0209 (20M39-138)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0210 (20M5-10)	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0211 (20M29-101), 0213 (22B16-65), 0214 (22B48-183)	<i>P. syringae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0212 (20M30-107)	<i>P. syringae</i>	<i>Triticum turgidum</i>
0215 (22C1-344), 0216 (22C1-360), 0217 (22C46-472)	<i>P. syringae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
0218 (20M2-5), 0219 (20M19-55), 0221 (20M50-163)	<i>P. trivialis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0220 (20M28-91)	<i>P. trivialis</i>	<i>Secale cereale</i>
0222 (20M3-6), 0223 (20M9-25), 0226 (20M22-66), 0227 (20M22-69), 0228 (20M26-83)	<i>P. graminis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0224 (20M15-43)	<i>P. graminis</i>	<i>Triticum dicoccum</i>
0225 (20M18-50)	<i>P. graminis</i>	<i>Triticum sphaerococcum</i>
0229 (20M28-98)	<i>P. graminis</i>	<i>Secale cereale</i>
0230 (20M3-7), 0231 (20M9-26), 0232 (20M26-84), 0233 (20M27-85), 0234 (20M27-86)	<i>P. poae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0235 (21K5-19), 0236 (22C1-339), 0237 (22C1-340), 0238 (22C1-341)	<i>P. poae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
0239 (20M5-9), 0241 (20M33-120), 0242 (20M34-124)	<i>P. viridiflava</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0240 (20M25-81)	<i>P. viridiflava</i>	<i>Triticum durum</i>
0243 (20M33-121)	<i>P. chlororaphis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0244 (22B27-152), 0246 (22B60-179)	<i>P. lutea</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0245 (22B62-155)	<i>P. lutea</i>	<i>Secale cereale</i>
0247 (22B11-316)	<i>P. orientalis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0260 (20M23-74)	<i>P. fluorescens</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0263 (20M31-109)	<i>P. fluorescens</i>	$\frac{1}{2}$ <i>Triticosecale</i>
0248 (20M1-1), 0262 (20M28-96), 0275 (20M55-177), 0286 (22B62-157)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Secale cereale</i>
0249 (20M6-13), 0250 (20M6-14), 0251 (20M7-21), 0252 (20M8-22), 0258 (20M19-56), 0259 (20M21-61), 0261 (20M24-80), 0264 (20M33-122), 0265 (20M38-136), 0266 (20M39-139), 0267 (20M40-142), 0268 (20M42-148), 0269 (20M43-149), 0270 (20M45-152), 0271 (20M49-162), 0272 (20M50-165), 0273 (20M51-166), 0274 (20M53-172), 2023, 0276 (21K16-63), 0278 (21K24-78), 0281 (22B58-6), 0283 (22B42-25), 0282 (22B42-23), 0284 (22B29-86), (22B52-181), 0288 (22B36-217), 0289 (22B33-225), 0290 (22B33-229), 0293 (22B11-317), 0295 (22C2-375), 0296 (22C8-394), 0298 (22To1-2), 0299 (22To1-3), 0300 (22To1-4), 0301 (2To1-8), 0302 (22To1-15)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum aestivum</i>
0253 (20M11-31), 0255 (20M13-40), 0256 (20M16-45)	<i>Pseudomonas</i> sp.	$\frac{1}{2}$ <i>Triticosecale</i>
0254 (20M12-38)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum turgidum</i>
0257 (20M17-49)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum sphaerococcum</i>
0277 (21K18-69), 0291 (22B23-279), 0292 (22B23-281), 0294 (22C1-334), 0297 (22C37-509)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Hordeum vulgare</i>
0279 (21K45-92), 0280 (21K59-101), 0303 (22To2-16), 0304 (22To2-19), 0305 (22To2-21)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Avena sativa</i>
0285 (22C28-107)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum durum</i>

*VNIKR-B – Коллекция фитопатогенных бактерий ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИ-ИР»). Происхождение штаммов, кроме VNIKR-B-0335 (DSM 7231) и VNIKR-B-0440 (CFBP 2216) – Российская Федерация; 20M означает «2020 год, регион сбора Москва», 21K означает «2021 год, регион сбора Крым», 22B означает «2022 год, регион сбора Волгоградская область», 22C означает «2022 год, регион сбора Ставропольский край», 22To означает «2022 год, регион сбора Томская область».

Для выделения ДНК применяли набор «Проба-ГС» (ЗАО «АгроДиагностика», Россия). Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия).

Таблица 2. Характеристики олигонуклеотидов, использованных в исследовании
Table 2. Characteristics of the oligonucleotides, used in the study

Олигонуклеотид [Oligonucleotide]	Последовательность 5'-3' [Sequence]	GC-состав, % [GC-content, %]	Tm*, °C	Источник [Source]
PscHrc662F	AGG CTT TAT GGA AAC CCT GA CG	50	62	Cottyn et al., 2010
PscHrc751R	ACA ATC ACC GCC ACG ATC AG	55	60	
PscP1	6FAM-CAA GCA GGC CAT GTT GCT GGT GGT G-BHQ1	60	71	Это исследование [This study]
PscF	AGG CTT TAT GGA AAC CCT GAC	48	60	

*Tm – температура плавления праймера.

Результаты исследования и обсуждение

В результате проведения теста PscHrc662F/PscHrc751R (Cottyn et al., 2010) с ДНК штаммов VNIKР-B-0201, VNIKР-B-0202, VNIKР-B-0203 и электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле, визуализированы фрагменты длиной 90 п.о. (рис. 1).

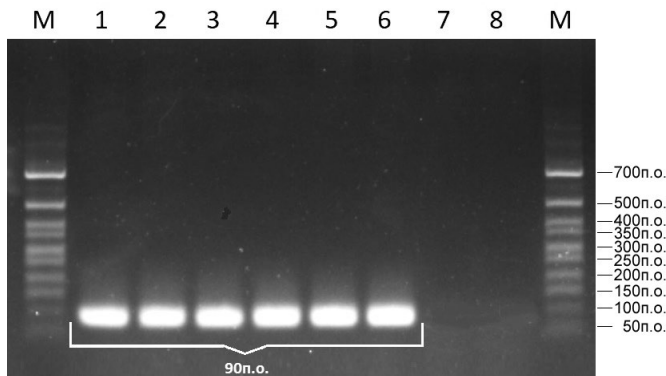


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов теста PscHrc662F/PscHrc751R с ДНК *Pseudomonas cichorii*.

Примечание: М – маркер длин ДНК 50+ bp;
1, 2 – ДНК штамма VNIKР-B-0201;
3, 4 – ДНК штамма VNIKР-B-0202;
5, 6 – ДНК штамма VNIKР-B-0203;
7, 8 – отрицательный контроль амплификации

Figure 1. Electropherogram of PscHrc662F/PscHrc751R test results of amplification of *Pseudomonas cichorii* DNA.

Note: M – DNA length marker 50+ bp; 1, 2 – DNA of strain VNIKР-B-0201; 3, 4 – DNA of strain VNIKР-B-0202; 5, 6 – DNA of strain VNIKР-B-0203; 7, 8 – negative amplification control

Путем проведения ПЦР *in silico* с праймерами PscHrc662F и PscHrc751R на последовательности генома штамма DSM 50259 (RefSeq NZ_CP007039.1) в программе Ugene 47 (Unipro UGENE software, [сайт] URL: <https://>

ucscgenome.ucsc.edu/Download/Download.do), получена нуклеотидная последовательность, представленная на рисунке 2.

Длина зонда была увеличена до 25 п.о., что привело к повышению температуры отжига с 48 °С до 71 °С. Указанное изменение позволило применить для модификации зонда стандартную и наиболее доступную по цене конструкцию 6FAM-/BHQ1 вместо MGB.

В результате проведения нового теста ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 со штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, получена специфичная реакция в виде экспоненциальной кривой флуоресценции по каналу FAM только для ДНК штаммов *Pc* (рис. 3).

Уровень флуоресценции для ДНК штаммов *Pc* составил от 1200 до 1600 оптических единиц (рис. 3). Отмечена неспецифичная реакция по каналу FAM для четырех штаммов – *P. poae* (VNIKР-B-0231), *P. graminis* (VNIKР-B-0225) и двух штаммов *P. fluorescens* (VNIKР-B-0260, VNIKР-B-0263). Важно отметить, что значение порогового цикла находилось в диапазоне от 35 до 37 (рис. 3). Исходя из того, что при тестировании остальных штаммов *Pseudomonas* spp., включая *P. poae* и *P. graminis*, реакция по каналу FAM не наблюдалась, можно сделать вывод о частичном сродстве используемых в тесте олигонуклеотидов с последовательностями генов некоторых бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из зерновых культур. Анализ доступных в базе данных NCBI геномов бактерий не позволяет окончательно подтвердить этот вывод. Отметим, что при идентификации штаммов в более ранней работе (Словарева и др., 2023) использовали праймеры PSF/PSR (Kazempour et al., 2009) длина ПЦР-продукта с которыми составляла около 600 п.о., и полученные с этими праймерами нуклеотидные последовательности сравнивали с другими последовательностями BLAST NCBI (BLAST..., <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для штамма VNIKР-B-0231 отмечено максимальное совпадение 99.49% с *P. poae*, а другие виды с таким



Рисунок 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов теста PscHrc662F/PscHrc751R с штаммами VNIKР-B-0201, VNIKР-B-0202, VNIKР-B-0203 и геномной последовательности штамма *Pseudomonas cichorii* DSM 50259 (RefSeq NZ_CP007039.1)

Figure 2. Nucleotide sequences alignment of PscHrc662F/PscHrc751R PCR products with strains VNIKР-B-0201, VNIKР-B-0202, VNIKР-B-0203 and the genomic sequence of the *Pseudomonas cichorii* strain DSM 50259 (RefSeq NZ_CP007039.1)

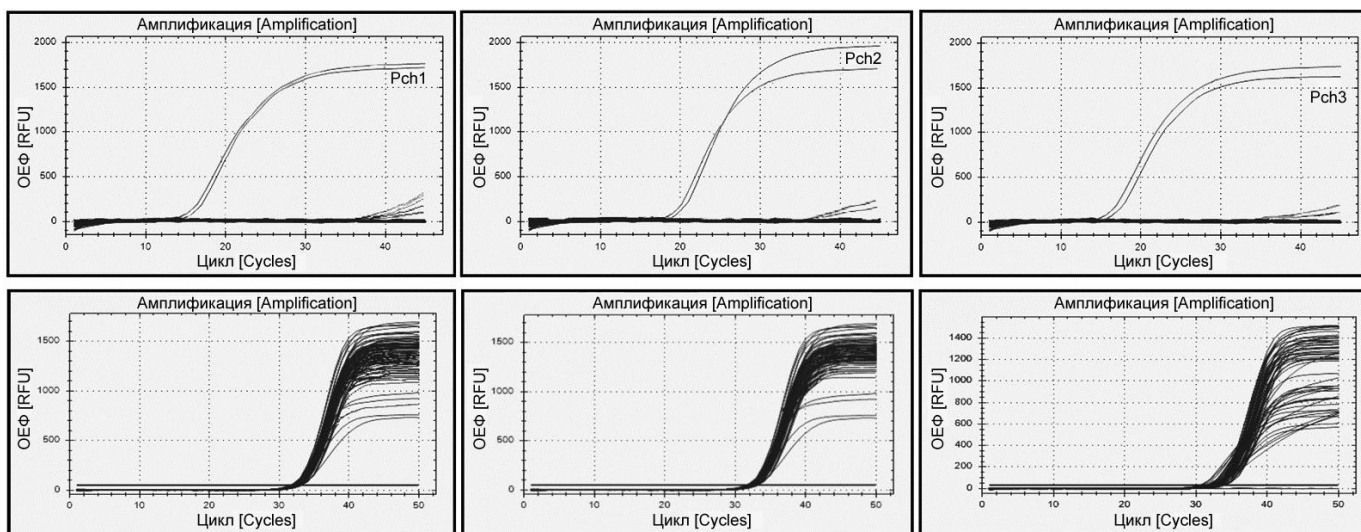


Рисунок 3. Зависимость уровня флуоресценции (ОЕФ) от номера порогового цикла (Ct) по каналу FAM при проведении теста PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК бактерий рода *Pseudomonas*

Figure 3. Dependence of the fluorescence level (RFU) on the threshold cycle number (Ct) via the FAM channel when performing the PscF/PscHrc751R/PscP1 test with DNA of *Pseudomonas* bacteria

же высоким совпадением отсутствовали. Принадлежность штамма VNIKР-B-0225 определена как *P. graminis* в связи с максимальным видовым сходством 98.17%. Для штаммов VNIKР-B-0260 и VNIKР-B-0263 ближайшим видом являлся *P. fluorescens* (99.43% для обоих штаммов). В то же время, результат выравнивания не показал совпадения с *P. cichorii* в числе первых 100 последовательностей с максимальным сходством. Следовательно, наличие перекрестных реакций при проведении ПЦР может являться результатом гомологии части олигонуклеотида с нуклеотидными последовательностями генов некоторых штаммов *Pseudomonas* sp. Исходя из полученных данных, при тестировании бактериальных культур может быть получено до 4% неспецифических реакций с поздним (от 35 до 37) пороговым циклом.

В результате тестирования других бактерий рода *Pseudomonas*, включая *P. fuscovaginae*, *P. syringae* (в том

числе патовары *syringae*, *coronafaciens*, *atrofaciens*, *aptata*), *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea*, *P. orientalis*, а также отрицательных контролей, специфическая реакция отсутствовала.

Для каждого тестируемого образца отмечена реакция внутреннего положительного контроля, детектируемая по каналу HEX (рис. 3) и указывающая на отсутствие ингибирования ПЦР. Таким образом, Новый тест PscF/PscHrc751R/PscP1 способен отличать штаммы *Pc* от других бактерий рода *Pseudomonas*.

В результате применения чашечного метода Коха, определены концентрации бактериальных суспензий *Pc*, используемых при оценке аналитической чувствительности нового теста ПЦР-РВ. Для подсчета использовали чашки Петри с высевными суспензиями *Pc* 4-го, 5-го и 6-го разведений (рис. 4).

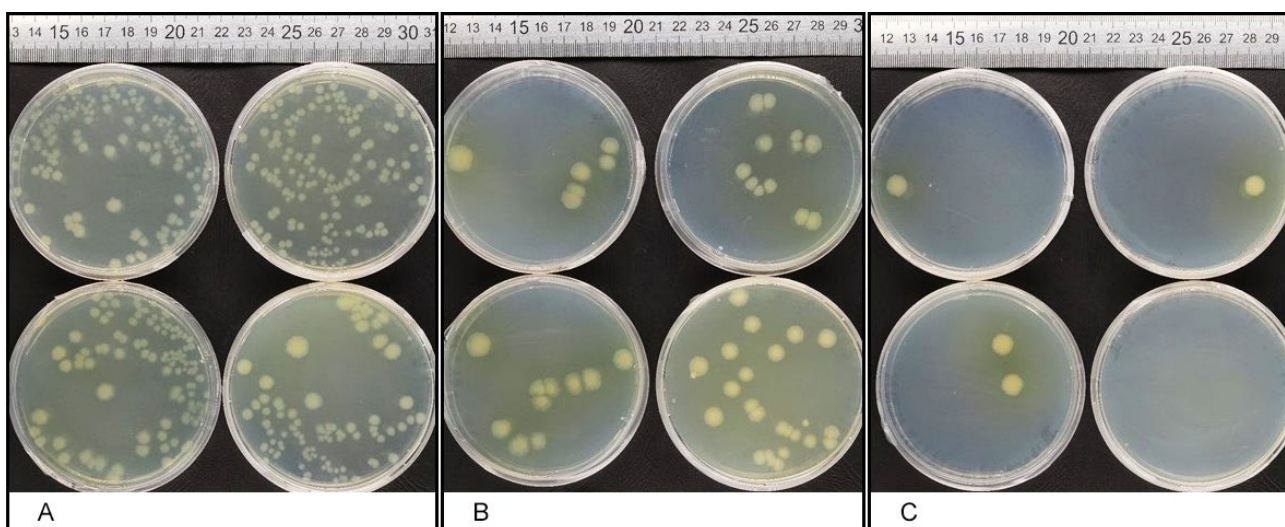


Рисунок 4. Чашки Петри с посевом на каждую по 50 мкл суспензий *Pseudomonas cichorii*
Примечание: А – 4-е разведение, В – 5-е разведение, С – 6-е разведение; спустя 6 суток инкубирования при температуре 27 °С, R2A

Figure 4. Petri dishes each plated with 50 µl of *Pseudomonas cichorii* suspensions
Note: A – 4th dilution, B – 5th dilution, C – 6th dilution; after 6 days of incubation at 27 °С, R2A

Спустя 6 суток инкубирования при 27°C суспензий *Pc*, высеянных на R2A (Reasoner, Geldreich, 1985), были отмечены глянцевые, беловатые, флуоресцирующие полупрозрачные колонии, круглой или неправильной формы, с плоским профилем и волнистым краем, диаметром от 1 до 9 мм (рис. 4). Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) показал, что для 4-го, 5-го и 6-го разведений культуры *Pc* соответствуют значения $2.4 \cdot 10^3$, $2.8 \cdot 10^2$ и $2.0 \cdot 10^1$ КОЕ/мл соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Число колониеобразующих единиц в 1 мл суспензии *Pseudomonas cichorii*

Table 3. Number of colony forming units in 1 ml of *Pseudomonas cichorii* suspension

Разведение [Dilution]	Среднее число КОЕ в 50 мкл [Average number of CFU in 50 µl]	КОЕ/мл [CFU/ml]
4'	120	$2.4 \cdot 10^3$
5'	14	$2.8 \cdot 10^2$
6'	1	$2.0 \cdot 10^1$

Учитывая, что все суспензии являлись серией последовательных десятикратных разведений одной суспензии, то для 3-го, 2-го и 1-го разведений соответствуют значения 10^4 , 10^5 и 10^6 КОЕ/мл соответственно, а начальной суспензии – 10^7 КОЕ/мл.

Оценка аналитической чувствительности теста PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК чистых культур показала, что тест способен обнаруживать *Pc* в анализируемом образце в концентрации более $2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл (рис. 5).

Положительные реакции отмечены в результате ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК суспензий *Pc* в концентрациях от $2 \cdot 10^1$ до 10^7 КОЕ/мл для каждого из повторов теста (рис. 5).

Таблица 4. Результат определения аналитической чувствительности теста PscF/PscHrc751R/PscP1 на ДНК *Pseudomonas cichorii*

Table 4. The result of determining the analytical sensitivity of the PscF/PscHrc751R/PscP1 test using *Pseudomonas cichorii* DNA

КОЕ/мл [CFU/ml]	Среднее значение Ct, FAM [Average Ct, FAM]	
	Чистая бактериальная культура [Pure bacterial culture]	Бактериальная культура в аналитической пробе семян [Bacterial culture in analytical seed sample]
$1 \cdot 10^7$	21.31	Не проводили
$1 \cdot 10^6$	26.3	Не проводили
$1 \cdot 10^5$	27.0	Не проводили
$1 \cdot 10^4$	29.89	32.53
$2.4 \cdot 10^3$	32.19	34.17
$2.8 \cdot 10^2$	35.79	37.47
$2.0 \cdot 10^1$	36.67	39.12

Заключение

В результате исследования разработана праймерная система для ПЦР в режиме «реального времени» PscF/PscHrc751R/PscP1, направленная на идентификацию возбудителя стеблевого меланоза пшеницы *P. cichorii*. Оценка аналитической чувствительности, проведенная с использованием референтных штаммов ДНК *P. cichorii* в воде и аналитической пробе семян пшеницы, показала способность теста к обнаружению патогена в анализируемом

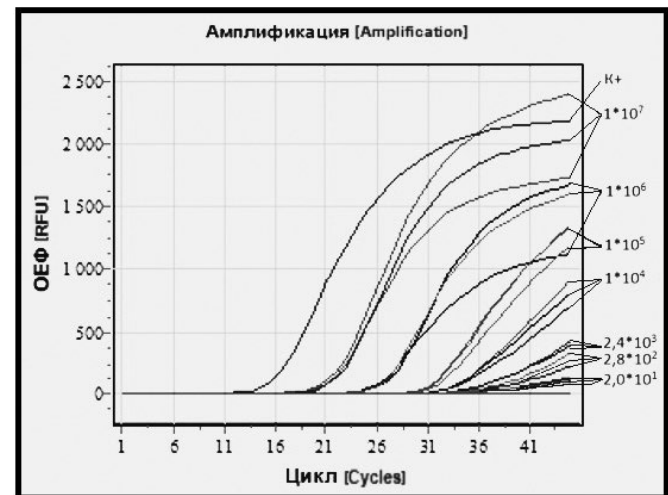


Рисунок 5. Результат теста PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Pseudomonas cichorii* VNIKR-B-0201 в концентрациях от 10^1 КОЕ/мл до 10^7 КОЕ/мл

Figure 5. The result of the PscF/PscHrc751R/PscP1 test with DNA isolated from bacterial suspensions of strain *Pseudomonas cichorii* VNIKR-B-0201 in concentrations from 10^1 CFU/ml to 10^7 CFU/ml

Тестирование образцов ДНК, выделенных из проб семян, зараженных суспензиями *Pc* и прошедших пробоподготовку, также показало аналитическую чувствительность теста $2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл (табл. 4).

Таким образом, тест ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 может быть использован для идентификации *Pc* как среды бактериальных культур, так и в семенном материале пшеницы.

образце при концентрации не менее $2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл. Оценка аналитической специфичности теста, проведенная с использованием ДНК 104 близкородственных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных преимущественно из зерновых культур, показала наличие неспецифичных реакций (флуоресценция на 35–37 пороговом цикле, накопление не имеет экспоненциальный вид) с 4 штаммами: *P. poae* (VNIKR-B-0231), *P. graminis* (VNIKR-B-0225)

и *P. fluorescens* (VNIKR-B-0260, VNIKR-B-0263). ПЦР-реакции с ДНК других бактерий рода *Pseudomonas*, включая *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea* и *P. orientalis* были отрицательными. ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1, в связи с высокой аналитической чувствительностью, может быть

использована в качестве отборочного теста в комплексе методов при идентификации *P. cichorii* в ходе установления фитосанитарного состояния растительной продукции и посевов, а также для идентификации патогена в чистых и смешанных бактериальных культурах.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ «ВНИИКР», регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 123022100104-4.

Библиографический список (References)

- Мувинги М, Словарева ОЮ, Заргар М (2022) Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в зерне пшеницы методом ПЦР. *Вестник Российского университета дружбы народов, Серия: Агронимия и животноводство*. 17(4): 473–483. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483>
- Словарева ОЮ (2023) Анализ производства и экспорта российского зерна и составление перечня регулируемых фитосанитарными требованиями стран-импортеров возбудителей бактериозов зерновых культур. *Аграрный вестник Северного Кавказа*. 3(51):47–54. doi:10.31279/2222-9345-2023-14-51-47-54
- Словарева ОЮ, Мувинги М, Яремко АБ, Игонин ВН, Рубец ВС (2023) Выявление значимых для экспорта зерна возбудителей бактериозов и комплекса сопутствующих микроорганизмов в посевах зерновых культур (на примере Тимирязевской полевой опытной станции). *Сельскохозяйственная биология*. 58(1):184–199. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.1.184rus>
- Тешич С, Пакина ЕН, Игнатов АН (2021) Идентификация *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 в гидропонном производстве салата. *Овощи России*. 3:110–115. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>
- Alippi AM (1996) First report of bacterial spot of celery caused by *Pseudomonas cichorii* in Argentina. *Plant Dis* 80(5):599. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0599C>
- Amadi JE, Omoniyi AM, Eze CS (2009) Isolation and identification of a bacterial blotch organism from watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai). *Afr J Agric Res* 4(11):37–39.
- Bastas KK (2013) Vegetable bacterial diseases in Turkey. *Eur J Plant Pathol Sci Biotechnol* 1S:14–24
- BLAST. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource]. – Access mode: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 2020–2022).
- Cambra MA, Palacio-Bielsa A, López MM (2004) Borage (*Borago officinalis*) is a new host of *Pseudomonas cichorii* in the Ebro Valley of Spain. *Plant Dis* 88(7):769–769. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.769A>
- Chase AR (1986) Comparison of three bacterial leaf spots of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Plant Dis* 70(4):334–336
- Cottyn B, Baeyen S, Pauwelyn E, Verbaendert I, De Vos P, Bleyaert P, Höfte M, Maes M (2010) Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathol* 3(60):453–461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02388.x>
- Cottyn B, Heylen K, Heyrman J, Vanhouteghem K, Pauwelyn E, Bleyaert P, Van Vaerenbergh J, Höfte M, De Vos P, Maes M (2009) *Pseudomonas cichorii* as the causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butterhead lettuce in Flanders. *Syst Appl Microbiol* 32(3):211–225. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.11.006>
- Elsisi AA (2019) Bacterial blight disease caused by *Pseudomonas cichorii* on chrysanthemum in Egypt. *J Phytopathol Pest Manag* 6(1):11–23
- Garibaldi A, Gilardi G, Moretti C, Gullino ML (2009) First Report of Leaf Spot Caused by *Pseudomonas cichorii* on *Coreopsis lanceolata* in Italy. *Plant Dis* 93(9):967. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0967A>
- Gill WM (1994) «Drippy gill»: An ooze disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici*. University of Canterbury. 234
- Grogan RG, Misaghi IJ, Kimble KA, Greathead AS, Ririe D, Bardin R (1977) Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology* 67(8):957–960.
- Gumtow RL, Aftab K, Bocsanczy AM, Yuen JMF, Palmateer AJ, Norman DJ (2013) First report of a leaf spot disease of golden dewdrop (*Duranta erecta*) caused by *Pseudomonas cichorii* and a *Xanthomonas* species in Florida. *Plant Dis* 97(6):836–836. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-12-1117-pdn>
- Hikichi Y, Saito A, Suzuki K (1996) Relationship between population dynamics of *Pseudomonas cichorii* on lettuce and disease incidence of bacterial rot of lettuce. *Jap J Phytopathol* 62(2):141–146
- Hikichi Y, Wali UM, Ohnishi K, Kiba A (2013) Mechanism of disease development caused by a multihost plant bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and its virulence diversity. *J Gen Plant Pathol* 79(6):379–389. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0461-7>
- Jang YW, Yoon YN, Maharjan R, Yi HJ, Jung MH, Hong SY, Lee MH, Kim SW, Kim JI, Yang JW (2023) First Report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial vein necrosis on perilla plants in South Korea. *Plant Dis* 107(2):549. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0143-PDN>
- Janse JD (1987) Biology of *Pseudomonas cichorii* in chrysanthemum 1. *EPPO Bull* 17(3):321–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00045.x>

- Kazempour MN, Kheyrghoo M, Pedramfar H, Rahimian H (2009) Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *Afr J Biotechnol* 9(20):2860–2865
- Malhi SS, Piening LJ, MacPherson DJ (1989) Effect of copper on stem melanosis and yield of wheat: Sources, rates and methods of application. *Plant Soil* 119:199–204.
- Marques E, Borges RCF, Uesugi CH (2016) Identification and pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* associated with a bacterial blight of gerbera in the Federal District. *Hortic Brasil* 34(2):244–248. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620160000200015>
- Miller JW, Knauss JF (1973) Bacterial blight of *Gerbera jamesonii* incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis Reporter* 57(6):504–505
- Miller WJ, Burgess SM, Lawson BO (1986) Leaf spot and blight of basil, *Ocimum basilicum* caused by *pseudomonas cichorii*. *Florida State Hortic Soc Proc* 99:249–251
- Osdaghi E (2020) *Pseudomonas cichorii* (bacterial blight of endive). 10.1079/ISC.44942.20210200740
- Patel N, Patel R, Wyenandt CA, Kobayashi DY (2021) First Report of *Pseudomonas cichorii* Causing Bacterial Leaf Spot on Romaine Lettuce (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) and Escarole (*Cichorium endivia*) in New Jersey. *Plant Dis* 105(12):4150. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0929-PDN>
- Pernezny K, Datnoff L, Sommerfeld ML (1994) Brown stem of celery caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis* 78(9):917–919
- Piening LJ, MacPherson DJ (1985) Stem melanosis, a disease of spring wheat caused by *Pseudomonas cichorii*. *Canadian J Plant Pathol* 7(2):168–172. <https://doi.org/10.1080/07060668509501496>
- Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49(1):1–7. <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>
- Rivera N, Amat Z, Hevesi M (1981) Capsicum leaf rot caused by *Pseudomonas cichorii* in Cuba. *Agrotecn Cuba* 13(2):67–72
- Rodrigues Neto J, Pereira ALG, Zagatto AG (1976) Bacterial spot caused by *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, 1928 on *Chrysanthemum morifolium* Ram leaves in Sao Paulo State. *Biologico* 42(5/6):118–122
- Sharma DK, Arora P (2016) Seed-borne and post-harvest diseases of sponge gourd (*Luffa Cylindrica* (L.) Rox.) and their management. *CIBTech J Microbiol* 5(2):4–8
- Sugiyama LS, Bushe BC, Heller WP, Keith LM (2018) First report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial leaf blight of *Plumeria pudica* in Hawaii. *Plant Dis* 102(5):1025–1025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1771-PDN>
- Surico G, Iacobellis NS (1978) Un marciume batterico del Sedano (*Apium graveolens* L.) causato da *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens (A bacterial soft rot of Celery (*Apium graveolens* L.) caused by *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens). *Phytopathol Mediterr* 17:69–71
- Trantas EA, Sarris PF, Mpalantinaki E, Pentari MG, Ververidis FN, Goumas DE (2013) A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *E J Plant Pathol* 137:477–493. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>
- Unipro UGENE software – [Electronic resource] access mode: <https://ugene.net/ru/download-all.html> (access date: 04/03/2023)
- Van Outryve MF, Gossele F, Swings J (1989) The bacterial microflora of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) leaves. *Microb Ecol* 18:175–186. <https://doi.org/10.1007/BF02030125>
- Wilkie JP, Dye DW (1974) *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. *New Zealand J Agric Res* 17(2):123–130. <https://doi.org/10.1080/00288233.1974.10420990>
- Wood BA, Easdown WJ (1990) A new bacterial disease of mung bean and cowpea for Australia. *Australasian Plant Pathology*. 19(1):16–21
- Yu SM, Lee YH (2012) First report of *Pseudomonas cichorii* associated with leaf spot on soybean in South Korea. *Plant Dis* 96(1):142–142. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0653>

Translation of Russian References

- Muvingi M, Slovareva OY, Zargar M (2022) Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in wheat seeds using PCR. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 17(4):473–483. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483>.
- Slovareva OY, Muvingi M, Iaremko AB, Igonin VN, Rubets VS (2023) Detection of bacteriosis pathogens significant for grain export and a complex of associated microorganisms in grain crops (on the example of Timiryazevskaya field experimental station). *Agricultural Biology*. 58(1):184–199. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2023.1.184rus>.
- Slovareva OY (2023) Production, export and import of cereals and compilation of a list of phytopathogenic bacteria associated with them. *Agrarian Bulletin of the North Caucasus*. 3(51):47–54. doi:10.31279/2222-9345-2023-14-51-47-54.
- Tesic S, Pakina EN, Ignatov AN (2021) Identification of *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 in hydroponic lettuce production. *Vegetable crops of Russia*. (3):110–115. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>.

IDENTIFICATION OF STEM MELANOSIS OF WHEAT (*PSEUDOMONAS CICHORII*)
BY REAL-TIME PCRE.V. Voronov¹, O.Y. Slovareva^{1*}, A.A. Desyaterik^{1,2}, M.O. Kondratiev¹, A.N. Ignatov³¹All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIKR”), Bykovo, Russia²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia³Peoples’ Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia

*corresponding author, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

The phytopathogenic bacterium, *Pseudomonas cichorii*, affects a wide range of crops in field and greenhouse production and causes wheat stem melanosis, which has been regulated by importers of Russian grain products. It is crucial to update the identification method based on real-time polymerase chain reaction (PCR) (PCR-RT). This method helps confirming *P. cichorii* in wheat samples. A 90 base pair long section of the *hrcRST* pathogenicity gene cluster was used as the target. Positive results were obtained for reference strains, confirmed by amplicon sequencing. Nucleotide sequences were then compared to the typical strain, DSM 50259. As a result of comparative DNA analysis, the sequences of the direct primer and probe were modified. The possibility of using a modification of 6FAM/BHQ1 dye/quencher available on the territory of the Russian Federation was demonstrated. The specificity of the new PCR-RT primer system PscF/PscHrc751R/PscP1 was assessed using 107 bacterial strains of the genus *Pseudomonas*, including *P. cichorii*, *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea* and *P. orientalis*. The DNA of 4 strains (*P. poae*, *P. graminis* and 2 strains of *P. fluorescens*) showed a non-specific reaction at the 35–37 cycle threshold, with an accumulation that did not appear exponential. The analytical sensitivity of the test allows for the detection of *P. cichorii* at a concentration of 10¹ CFU/mL. The PCR-RV PscF/PscHrc751R/PscP1 test can be used as a screening tool for the detection of *P. cichorii* in plant products and for the characterization of pure bacterial cultures.

Keywords: RT-PCR, bacterioses of grain crops, phytosanitary requirements, plant quarantine, diagnosis of phytopathogens, molecular genetic identification methods

Submitted: 16.08.2024

Accepted: 01.11.2024

ПОДБОР ФРАГМЕНТА δ -ЛАТРОИНСЕКТОТОКСИНА ИЗ ЯДА КАРАКУРТА *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ

С.А. Тимофеев^{1*}, А.Г. Шухалова¹, О.А. Павлова^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: ts-bio@ya.ru

Токсины из ядов хищных и паразитоидных членистоногих, например скорпионов, пауков или ос наездников, используют в качестве перспективного инструмента в различных областях защиты растений от насекомых вредителей. Для исследования подобных молекул в лабораторных условиях во многих случаях может быть полезным создание к ним поликлональных антител, что позволит использовать специфичные методы их детекции и очистки. В представленном исследовании осуществлена гетерологичная экспрессия δ -латроинсектотоксина из яда каракурта *Latrodectus tredecimguttatus*, а также его N- и C-концевых фрагментов в клетках *Escherichia coli* при различных температурах и условиях аэрации. Независимо от условий экспрессии накопление рекомбинантного белка в клетках бактерий в виде телец включений наблюдалось только для C-концевого фрагмента токсина. Высокая эффективность экспрессии этого фрагмента позволила использовать нерастворимую белковую фракцию гомогената бактерий для иммунизации мышей и создания антител к δ -латроинсектотоксину. Антигенсвязывающая активность иммуноглобулинов была подтверждена с помощью иммуноблоттинга изучаемого фрагмента токсина, синтезированного в бактериях с помощью вектора с удаленными лидерными последовательностями. Полученные антитела могут быть использованы для детекции токсина каракурта при его экспрессии в различных системах, например при создании генетически модифицированных энтомопатогенных грибов или вирусов.

Ключевые слова: биологическая защита растений, гетерологичная экспрессия, поликлональные антитела

Поступила в редакцию: 13.08.2024

Принята к печати: 15.10.2024

Введение

Биологическая борьба с вредителями в сельском хозяйстве представляет собой безопасную и экологически чистую альтернативу широко распространенному использованию синтетических пестицидов (Kumar and Singh, 2015). Разнообразные естественные враги насекомых, включая членистоногих хищников или паразитоидов, а также патогенные организмы, такие как бактерии, вирусы и грибы, как по отдельности, так и в комбинациях, могут быть использованы для этой цели (Koller et al., 2023). Тем не менее, этот подход лишен недостатков, включая относительно низкие темпы искоренения вредителей, уязвимость патогенов к влиянию окружающей среды и т. д. (Moscardi, 1999). В определенной степени эту проблему можно решить с помощью генетической модификации патогенов насекомых, направленной на повышение их вирулентности и устойчивости (Kroemer et al., 2015; Lovett and St. Leger, 2018).

Пауки рода *Latrodectus* (черные вдовы) считаются одними из наиболее «ядовитых» паукообразных. Их яд имеет крайне широкий спектр действия и смертельно опасен как для насекомых и других членистоногих, так и для млекопитающих (Yan et al., 2015; Wang et al., 2019). На сегодняшний день из ядов этих пауков выделены и характеризованы десятки белковых токсинов, часто оказывающих специфичное действие на определенную группу животных (Wang et al., 2007; Yan et al., 2015; Wang et al., 2019).

Важное отличие ядов черных вдов от ядов других членистоногих состоит в преобладании в них уникальных высокомолекулярных белков (более 100 кДа) над лишь небольшим числом пептидов (Wang et al., 2007; He et al., 2013). Одна из групп таких молекул – латроинсектотоксины (latroinsectotoxins), оказывающие воздействие исключительно на насекомых, но не опасные для млекопитающих. Например, для α -латроинсектотоксина показана способность образовывать поры в липидных мембранах насекомых в области нервно-мышечных синапсов, что приводит к массовым неспецифическим выбросам нейромедиаторов (Wang et al., 2019). Несмотря на то, что данный токсин способен образовывать подобные поры и в искусственно созданных липидных мембранах, токсичное воздействие на нервно-мышечную систему наблюдается только при инъекции белка насекомым. Предполагается, что подобная специфичность определяется взаимодействием токсина с определенными рецепторами клеток насекомых, облегчающими прикрепление токсина к мембране (Rohou and Ushkaryov, 2007).

Объектом этого исследования является δ -латроинсектотоксин (δ ЛИТ), выделенный из яда паука *L. tredecimguttatus* и характеризованный еще в конце прошлого века. Тогда была определена кодирующая данный белок последовательность кДНК длиной 3642 пар нуклеотидов (Дулубова и др. 1996). Впоследствии авторы продемонстрировали,

что полноразмерная форма белка не является активной, и в его состав также входит С-концевой домен, удаляемый при процессинге молекулы (Dulubova et al., 1996). В этом исследовании авторам также удалось экспрессировать активную форму белка в бактериях и продемонстрировать его высокую токсичность для насекомых (ЛД₅₀ = 10–50 мкг на кг веса тела личинок комнатной мухи). В последующих исследованиях была определена третичная структура данного белка (Chen et al., 2021), а также показано, что этот токсин экспрессируется исключительно у самок каракуртов и только в их ядовитых железах, тогда как многие другие токсины этой группы выделяют и из других органов пауков (Togres et al., 2022).

Специфичное действие латроинсектотоксинов на насекомых и их безопасность для человека делает эти молекулы перспективными для использования в защите растений как в качестве непосредственно потенциальных пестицидов, так и для создания на их основе генетически модифицированных организмов, используемых в качестве биопестицидов. Последовательности, кодирующие токсины из ядов членистоногих, широко применяются для создания рекомбинантных энтомопатогенных грибов или бакуловирусов с повышенной вирулентностью (Kroemer et al., 2015; Lovett et al., 2018), однако латроинсектотоксины еще не были исследованы в этом контексте. Важным этапом создания и изучения таких рекомбинантных патогенов

является получение антител к белкам, чьи кодирующие последовательности встраиваются в их геномы. Специфичные антитела позволяют детектировать изучаемую молекулу на любом этапе экспрессии и демонстрировать, действительно ли изучаемый продукт секретируется патогеном в организм насекомого-вредителя.

Несмотря на то, что активная форма дЛИТ уже была успешно синтезирована в бактериях ранее, авторы отмечали крайне низкую эффективность экспрессии. Рекомбинантный белок составлял лишь доли процента от общего состава гомогената бактерий (Dulubova et al., 1996). Для препаративной наработки рекомбинантного белка и получения антител необходимо значительно увеличить выход продукта. При этом, для иммунизации не обязательно синтезировать белок целиком, может быть достаточно и фрагмента молекулы (Bobkova et al., 2014).

В задачи представленной работы входили оптимизация условий бактериальной экспрессии и получение поликлональных антител к δ-латроинсектотоксину *L. tredecimguttatus*, необходимых для дальнейшего изучения молекулы при ее встраивании в геномы других организмов. В связи с этим в рамках данной работы, помимо подбора различных условий экспрессии дЛИТ в бактериях, была осуществлена наработка С- и N-концевых фрагментов молекулы размером 593 и 394 аминокислотных остатка, соответственно.

Материалы и методы

Молекулярное клонирование

Последовательность мРНК, кодирующая δ-латроинсектотоксин *L. tredecimguttatus*, находится в открытом доступе на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pucco/X92679>). Участок последовательности, кодирующий активную форму токсина размером 991 аминокислотных остатка (Dulubova et al., 1996), синтезирован *de novo* в составе плазмиды pVAX в компании Евроген (Россия) с добавлением N-концевого сигнального пептида (СП) белка Mc11 энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABB20937.1>). Кодоны для синтеза были подобраны таким образом, чтобы в составе последовательности присутствовали сайты распознавания ферментами рестрикции: *Bam*HI в начале последовательности, *Kpn*I на участке между СП и дЛИТ, *Pst*I в срединной части дЛИТ и *Eco*RI в конце (рис. 1). Для гетерологичной экспрессии участок дЛИТ без СП переклонировали с сохранением рамки считывания по ранее описанной методике (Timofeev et al., 2024) в вектор pRSET C (Thermo Fisher Scientific, США) по сайтам рестрикции *Kpn*I и *Eco*RI; N-коцевой фрагмент по сайтам рестрикции *Kpn*I и *Pst*I в тот же вектор. С-концевой фрагмент переклонировали в вектор pRSET B и в модифицированный pRSET B, с удаленным С-терминальным тагом и лидерными последовательностями, полученный ранее (Dolgikh et al., 2020) по сайтам *Pst*I и *Eco*RI. Корректность встраивания последовательностей в плазмиды проверяли секвенированием (Евроген, Россия).

Гетерологичная экспрессия δ-латроинсектотоксина в *Escherichia coli*

Для гетерологичной экспрессии фрагментов дЛИТ в бактериях использовали штамм *E. coli* C41, полученный

на основе штамма BL21(DE3). Трансформацию бактерий конструкциями на основе векторов pRSET проводили с помощью электропоратора Electroporator 2510 (Eppendorf, Germany). Колонии бактерий из агаризированных чашек со средой Luria Broth (LB), содержащей 0.15 мг/мл ампициллина, инокулировали в герметично закрытые конические пробирки емкостью 50 мл (анаэробные условия) или в вентилируемые колбы емкостью 100 мл (аэробные условия) с 20 мл той же жидкой среды. Культуры выращивали до оптической плотности 600 = 0.6, затем индуцировали экспрессию добавлением 0.1 мМ изопропил β-d-1-тиога-лактопиранозид (ИПТГ) (конечная концентрация) с последующей инкубацией при комнатной температуре или при 37°C в течение 15 ч. После культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут и обрабатывали ультразвуком в 50 мМ ТБС (50 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 150 мМ NaCl) с использованием ультразвукового гомогенизатора Qsonica q700 (Qsonica, СТ). После 10-минутного центрифугирования при 15000 g образцы белка для электрофореза в полиакриламидном геле готовили из супернатанта, а также нерастворимого осадка, содержащего тельца включения белка (IBS), ресуспендированные в равном супернатанту объеме ТБС. Электрофорез белковых проб и иммуноблотинг с использованием антител к полигистидиновой последовательности (Merck, Германия) проводили, как это было описано ранее (Dolgikh et al., 2020; Timofeev et al., 2024).

Получение и проверка поликлональных антител к δ-латроинсектотоксину

Для иммунизации мышей (беспородные мыши из питомника лабораторных животных «Рапполово»), содержащихся в виварии лаборатории микробиологической защиты растений ФБГНУ ВИЗР, использовали тела

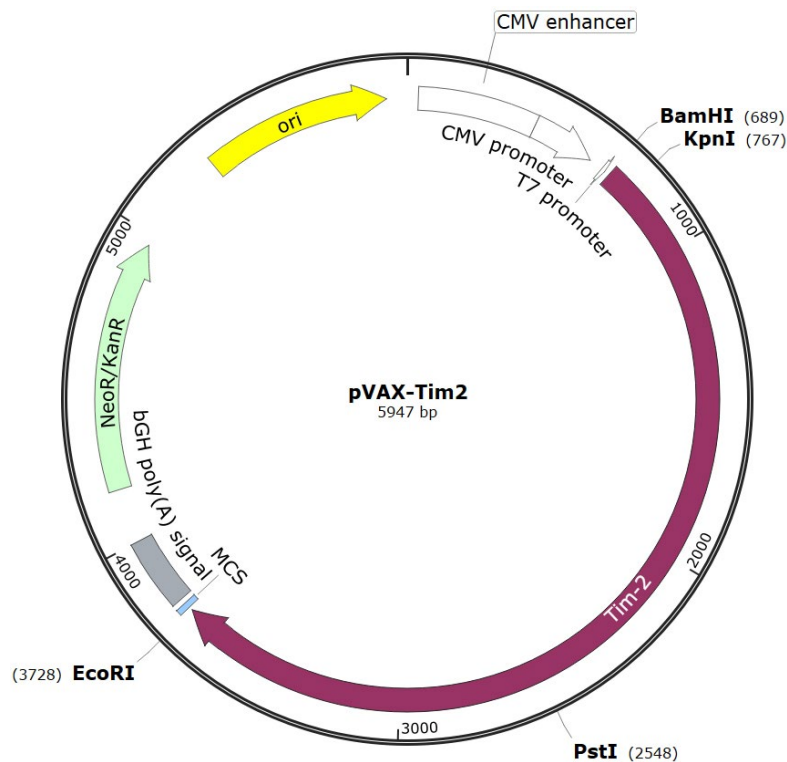


Рисунок 1. Схема конструкции на основе вектора pVAX1, в который была синтезирована кДНК активной формы δ -латроинсектотоксина *L. tredecimguttatus* с сигнальным пептидом белка Mcl1 *M. anisopliae*. δ -латроинсектотоксин обозначен как Tim-2, отмечены сайты рестрикции, по которым происходило переклонирование токсина и его фрагментов в другие плазмиды для гетерологичной экспрессии

Figure 1. Diagram of the construct based on the pVAX1 vector. The cDNA of the active form of δ -latroinsectotoxin from *L. tredecimguttatus* with signal peptide of the *M. anisopliae* Mcl1 protein was synthesized into the vector. δ -latroinsectotoxin is designated as Tim-2, with restriction sites marked indicating where the toxin and its fragments were subcloned into other plasmids for heterologous expression

включения С-концевого фрагмента δ ЛИТ, осажденные после обработки ультразвуком образцов, культивированных в вентилируемых колбах при 37 °С. Тельца включения промывали 50 мМ ТБС 3 раза и растворяли в 50 мМ ТБС с 1% додецилсульфатом натрия (SDS). Избыточный SDS удаляли диализом против в 50 мМ ТБС с помощью набора для диализа Pur-A-Lyzer™ Maxi 6000 (Merck, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрации белка в образце определяли коллометрически с помощью метода Брэдфорда с использованием спектрофотометра pr80 (Implen, Германия). Сохранность белка в пробах после диализа также проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Мышей иммунизировали 4 внутрибрюшными инъекциями по 100 мкг белка с интервалом 10 дней, отбирая кровь спустя 10 дней после последней иммунизации. Для этого животных усыпляли парами хлороформа и проводили декапитацию. Кровь настаивали в

течение суток при температуре 37 °С, удаляя основную часть клеточных элементов вместе с образовавшимся тромбом. Оставшиеся клеточные элементы крови осаждали центрифугированием при 3000g в течение 20–30 минут. Полученную сыворотку разводили глицерином 1:1 и хранили при -20 °С. Для проверки сыворотки на наличие в ней антител к δ ЛИТ ее использовали в разведении 1:2000 для иммуноблотинга С-концевого фрагмента токсина, экспрессированного с помощью модифицированного вектора pRSET B с удаленным С-терминальным тагом и лидерными последовательностями. В качестве контроля использовали аналогичную пробу гомогената бактерий, полученную после трансформации вектором pRSET B с геном *vpr1* *Pimpla hypochondriaca* (Dani et al., 2010). В качестве вторичных антител использовали анти-мышинные конъюгаты с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты

Последовательность, кодирующая активную часть δ ЛИТ *L. tredecimguttatus*, слитую с СП белка Mcl1 *M. anisopliae*, была синтезирована *de novo* в составе вектора pVAX1. Последовательность, соответствующая активной форме токсина без СП, а также С- и N-концевые фрагменты молекулы размером 593 и 394 аминокислотных остатка, соответственно, были переклонированы в вектор pRSET B. Этот вектор обеспечивает экспрессию в

клетках *E. coli* под контролем промотора T7 и индукцию изопропил β -d-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ). Клетки бактерий после 15 часовой экспрессии в аэробных или анаэробных условиях, при 37 °С или при комнатной температуре полноразмерного токсина, а также его С- и N-концевых фрагментов, гомогенизировали ультразвуком, отделяли фракции растворимых и нерастворимых белков, которые впоследствии подвергали электрофорезу

в полиакриламидном геле и окрашивали Кумасси бриллиантовым синим. Эксперимент выявил накопление мажорного белка только в пробах с экспрессией С-концевого фрагмента δ ЛИТ (рис. 2). Независимо от условий экспрессии, белок молекулярной массой около 46–48 кДа, что соответствовало предполагаемому размеру фрагмента в 43 кДа с добавленным 4 кДа С-терминальным тагом, входящим в состав вектора pRSET B, накапливался в клетках в виде нерастворимых телец включений в количестве, значительно превышающем другие бактериальные белки. Иммуноблоттинг с антителами против полигистидиновой последовательности, входящей в С-терминальный участок вектора, подтвердил соответствие наблюдаемой полосы рекомбинантному белку (рис. 2 f). На основании этого С-терминальный фрагмент был использован в качестве антигена для получения поликлональных антител к δ ЛИТ.

Тела включения с δ ЛИТ после экспрессии в аэробных условиях при 37°C дополнительно отмывали от остатков

растворимых белков бактерий и растворяли в слабом растворе детергента, удаляя затем его излишки с помощью диализа. Подготовленный таким образом препарат использовали для иммунизации мышей. Сохранность белка после диализа проверяли с помощью электрофореза (рис. 2 e). Для проверки сыворотки, полученной после завершения цикла иммунизаций, на наличие в ней антител к δ ЛИТ мы экспрессировали фрагмент δ ЛИТ с использованием модифицированного вектора pRSET B с удаленным С-терминальным тагом, содержащим так называемые лидерные последовательности: Полигистидиновый участок, T7 gene 10 leader, Xpresssm EpiCore. При экспрессии изучаемого фрагмента δ ЛИТ с помощью модифицированного вектора в таких же условиях, как и при подготовке антигена для иммунизации, окрашивание суммарных белков Кумасси продемонстрировало наиболее выраженное накопление белка размером около 37 кДа в нерастворимой бактериальной фракции при ожидаемом размере продукта

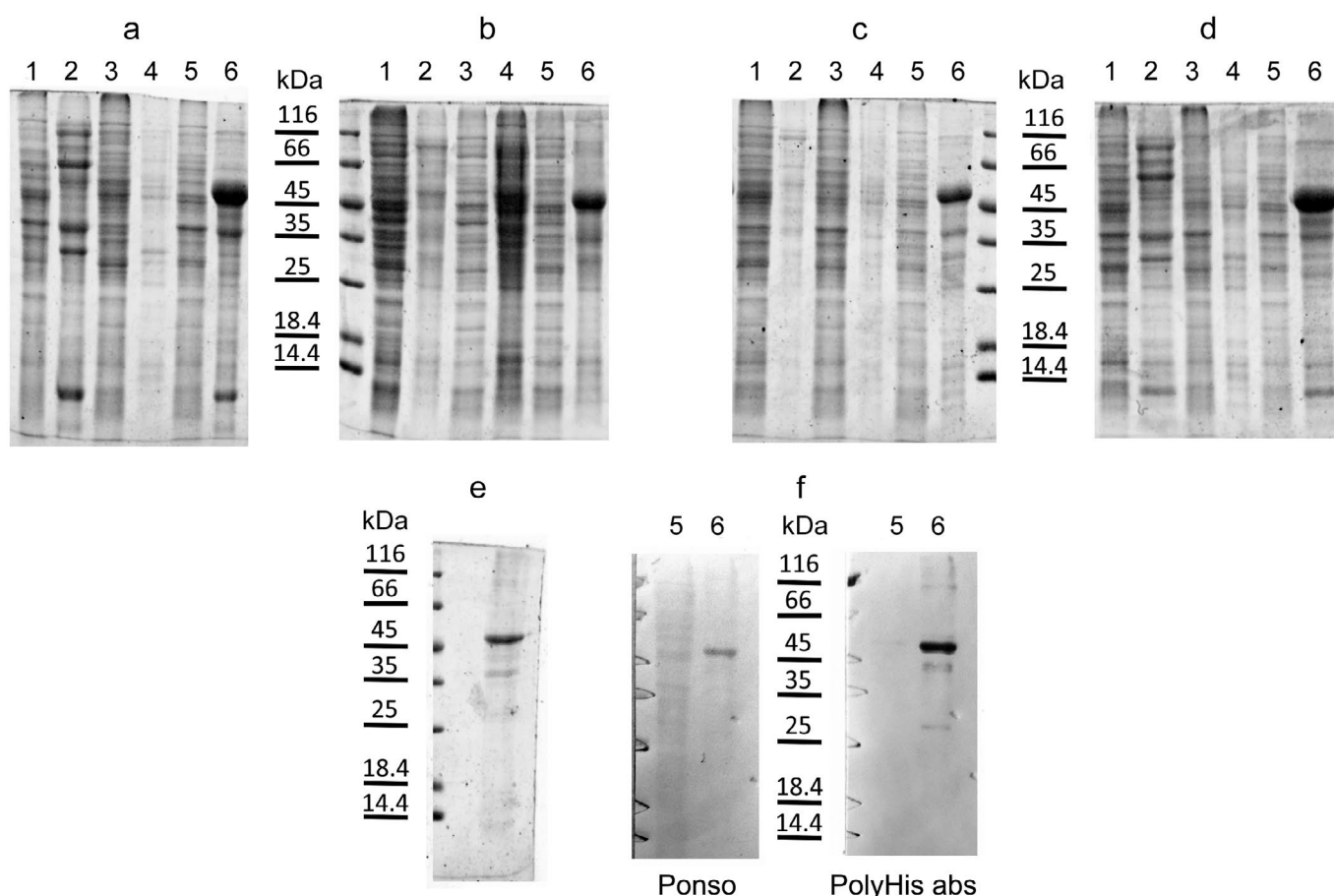


Рисунок 2. Экспрессия δ -латроинсектотоксина (δ -lit) *L. tredecimguttatus* в *E. coli*. а – экспрессия при комнатной температуре в анаэробных условиях; б – экспрессия при комнатной температуре в аэробных условиях; с – экспрессия при 37°C в анаэробных условиях; д – экспрессия при 37°C в аэробных условиях; е – С-концевой фрагмент δ -lit после растворения телец включения детергентом и диализа; ф – иммуноблоттинг С-концевого фрагмента δ -lit с антителами к полигистидиновой последовательности (PolyHis abs); 1, 2 – экспрессия полноразмерного токсина (фракция растворимых белков и не растворимый осадок после гомогенизации соответственно), 3, 4 – экспрессия N-концевого фрагмента δ -lit, 5, 6 – экспрессия С-концевого фрагмента δ -lit

Figure 2. Agarose gel electrophoresis showing expression of δ -latroinsectotoxin (δ -lit) from *L. tredecimguttatus* in *E. coli*. a) at room temperature under anaerobic conditions; b) at room temperature under aerobic conditions; c) at 37°C under anaerobic conditions; d) at 37°C under aerobic conditions; e) C-terminal fragment of δ -lit after solubilization of inclusion bodies with SDS detergent and dialysis; f) – immunoblotting of the C-terminal fragment of δ -lit with antibodies (abs) against the polyhistidine (PolyHis) sequence; 1, 2 – expression of the full-length toxin (soluble protein fraction and insoluble pellet after homogenization, respectively), 3, 4 – expression of the N-terminal fragment of δ -lit, 5, 6 – expression of the C-terminal fragment of δ -lit

в 43 кДА (рис. 3). Однако окрашивание с помощью полученной сыворотки выявило в данной пробе полосу соответствующего δ ЛИТ размера, а также ряд полос более низкой массы, отсутствующих в контроле (проба после экспрессии в тех же условиях другого белка). Помимо

токсина, окрашивание с помощью полученной сыворотки выявляло ряд бактериальных белков, что объясняется использованием для иммунизации бактериального гомогената, однако все эти белки окрашивались и в контрольной пробе.

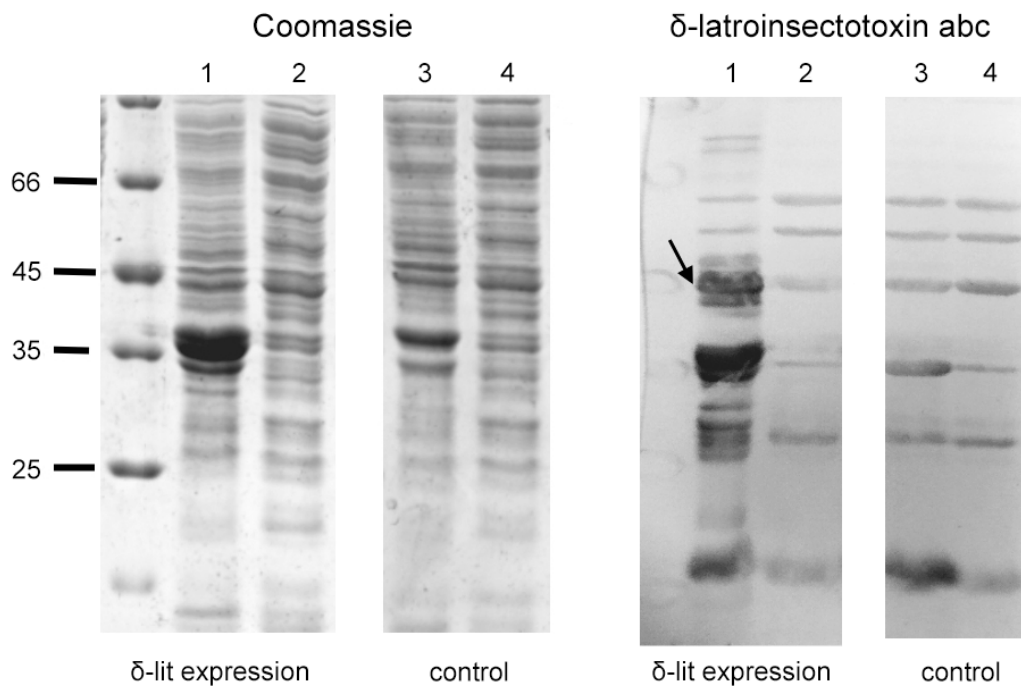


Рисунок 3. Проверка полученных антител (abs) с помощью иммуноблоттинга проб бактерий, экспрессирующих белок С-концевой участок дельта-латроинсектотоксина (δ -lit) без полигистидиновой и лидерных последовательностей. (1, 3 – нерастворимая фракция после гомогенизации бактерий, 2, 4 – супернатант, содержащий растворимые белки)

Figure 3. Verification of the antibodies (abs) obtained from immunized mice using immunoblotting of bacterial samples expressing the C-terminal region of δ -latroinsectotoxin (δ -lit) without the polyhistidine and leader sequences.

Lane 1, 3 – insoluble fraction after bacterial homogenization, 2, 4 – supernatant containing soluble proteins

Обсуждение

В рамках данной работы описан процесс получения поликлональных антител как первый этап изучения δ -латроинсектотоксина из яда паука *L. tredecimguttatus* в качестве эффекторной молекулы для генетической модификации энтомопатогенов. Данный процесс нам удалось осуществить без опасной для исследователей работы со смертельно ядовитым каракуртом. Данная задача была решена за счет химического синтеза кодирующей δ ЛИТ последовательности и иммунизации животных синтезированным в бактериальных клетках фрагментом молекулы. Авторы, впервые характеризовавшие изучаемый токсин, уже осуществляли его бактериальную экспрессию, однако крайне низкий уровень синтеза позволял провести лишь функциональный анализ рекомбинантного белка, но не использовать его для иммунизации. (Dulubova et al., 1996). Несмотря на то, что в этой работе мы использовали более современную и усовершенствованную систему бактериальной экспрессии, молекулярная масса токсина более чем в 120кДА делала незначительной вероятность добиться высокого уровня синтеза в бактериях (Verrow et al., 2006). По этой причине еще на этапе оптимизации кодонов для синтеза последовательности δ ЛИТ мы заложили в нее несколько сайтов распознавания ферментами рестрикции, не меняя аминокислотного состава соответствующего белка, что позволило клонировать в векторе для бактериальной

экспрессии как полноразмерный белок, так и его С- и N-концевые фрагменты.

Осуществив первичную экспрессию полноразмерного белка в стандартных условиях, описанных в инструкции к использованному вектору pRSET B и не наблюдая эффективного синтеза (результаты не указаны), мы приступили к подбору условий экспрессии и выбору оптимального фрагмента молекулы для синтеза. Для этого токсин и его концевые фрагменты экспрессировали при пониженном уровне индуктора экспрессии в разных условиях аэрации и температуры. Такие параметры были выбраны на основании прошлого опыта экспрессии потенциально токсичных для бактерий молекул из ядов членистоногих, вариация в которых может приводить к различному более чем на порядок уровню экспрессии (Timofeev et al., 2024). В том же исследовании мы показали, что для получения поликлональных антител достаточно синтезировать в бактериях антиген для иммунизации в нерастворимой форме с дальнейшим его растворением в детергенте с последующим диализом. Необходимой для этого уровень экспрессии можно определить за счет электрофореза гомогената бактерий после экспрессии с окрашиванием белков Ку-масси, и простого визуального анализа соотношения полос, соответствующих рекомбинантному белку и другим молекулам в гомогенате. Подобный анализ для δ ЛИТ и его

фрагментов показал, что необходимый уровень экспрессии наблюдается только для С-терминального фрагмента не зависимо от условий экспрессии. На основании этого С-терминальный фрагмент был использован в качестве антигена для иммунизации животных и получения поликлональных антител к δЛИТ.

Для проверки сыворотки, полученной после завершения цикла иммунизаций, на наличие в ней антител к δЛИТ, мы экспрессировали фрагмент δЛИТ с использованием модифицированного вектора pRSET B с удаленным С-терминальным тагом, содержащим так называемые лидерные последовательности: Полигистидиновый участок, T7 gene 10 leader, Xpresssm Eritore. Эти последовательности необходимы для обеспечения возможности идентификации и очистки рекомбинантного белка, а также для значительного увеличения уровня экспрессии. Однако этот участок обладает высокой иммуногенностью, и при иммунизации животных содержащим его белком могут образоваться антитела, специфичные к этому фрагменту (Dolgikh et al., 2022). Поэтому для доказательства создания антител к δЛИТ необходимо было показать распознавание ими этой молекулы без С-терминального тага. В рамках этой работы нам удалось установить, что полученная антисыворотка специфично окрашивает синтезированный в подобных условиях антиген, что подтверждает получение антител к рекомбинантному токсину. Для проверки специфичности

полученных антител необходимо будет продемонстрировать распознавание ими полноразмерного токсина, например, синтезированного с помощью бакуловирусной экспрессии в культуре клеток насекомых, что представляет будущую задачу этой работы при использовании δЛИТ для создания рекомбинантных бакуловирусов. Возможность такого синтеза функционально активной молекулы для сходного с δЛИТ α-латроинсектотоксина *L. tredecimguttatus* была установлена еще в прошлом веке (Kiyatkin et al., 1995).

Таким образом, на примере δЛИТ в этой работе мы описали простую и эффективную методику получения антител к высокомолекулярному токсину, синтез полноразмерной копии которого в бактериях оказался значительно затруднен. Метод исключает контакт со смертельно опасным членистоногим, позволяет использовать на всех этапах одну изначально синтезированную последовательность ДНК, не требует количественных методов определения уровня экспрессии белка, применения хроматографии или других методов для его очистки, и таким образом является максимально эффективным и экономящим время. Полученные в этой работе антитела в будущем позволят идентифицировать изучаемый белок при создании на его основе биоинсектицидов, например, генетически модифицированных энтомопатогенных грибов или вирусов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант 23-26-00039.

Библиографический список (References)

- Дулубова ИЕ, Хвощев МВ, Красноперов ВГ, Галкина ТГ, Плужников КА, Волкова ТМ, Гришин ЕВ (1996) Первичная структура δ-латроинсектотоксина из яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus*. *Биоорганическая химия* 22(1):68–73
- Chen M, Blum D, Engelhard L, Raunser S, Wagner R, Gatsogiannis C (2021) Molecular architecture of black widow spider neurotoxins. *Nat Commun* 12(1):6956. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26562-8>
- Dulubova IE, Krasnoperov VG, Khvotchev MV, Pluzhnikov KA, Volkova TM, Grishin EV, Vais H, Bell DR, Usherwood PN (1996) Cloning and structure of delta-latroinsectotoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family: functional expression requires C-terminal truncation. *J Biol Chem* 271(13):7535–7543. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7535>
- Yan S, Wang X (2015) Recent advances in research on widow spider venoms and toxins. *Toxins* 7(12):5055–5067. <https://doi.org/10.3390/toxins7124862>
- Lovett B, St Leger RJ. (2018) Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Manag Sci* 74(4):781–789. <https://doi.org/10.1002/ps.4734>
- Berrow NS, Büssov K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers GE, Levy N, Lieu V, Owens, RJ, Peleg Y, Pinaglia C, Quevillon-Cheruel S, Salim L, Scheich C, Vincentelli R, Busso D (2006) Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallogr* 62:1218–1226. <https://doi.org/10.1107/S0907444906031337>
- Bobkova NV, Medvinskaya NI, Kamynina AV, Aleksandrova IY, Nesterova IV, Samokhin AN, Korojev DO, Filatova MP, Nekrasov PV, Abramov AY, Leonov SV, Volpina OM (2014) Immunization with either prion protein fragment 95-123 or the fragment-specific antibodies rescue memory loss and neurodegenerative phenotype of neurons in olfactory bulbectomized mice. *Neurobiol Learn Mem* 107:50–64. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.10.019>
- Dani MP, Richards EH (2010) Identification, cloning and expression of a second gene (vpr1) from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca* that displays immunosuppressive activity. *J Insect Physiol*. 56(2):195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.006>
- Dolgikh VV, Timofeev SA, Zhuravlyov VS, Senderskiy IV (2020) Construction and heterologous overexpression of two chimeric proteins carrying outer hydrophilic loops of *Vairimorpha ceranae* and *Nosema bombycis* ATP/ADP carriers. *J Invertebr Pathol* 171:107337. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107337>
- Dolgikh VV, Zhuravlyov VS, Senderskiy IV, Ignatieva AN, Timofeev SA, Seliverstova EV (2022) Heterologous expression of scFv fragment against *Vairimorpha (Nosema) ceranae* hexokinase in Sf9 cell culture inhibits microsporidia intracellular growth. *J Invertebr Pathol* 191:107755. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107755>
- He Q, Duan Z, Yu Y, Liu Z, Liu Z, Liang S (2013) The venom gland transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. *PLoS One* 8(11):e81357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081357>

- Kiyatkin NI, Kulikovskaya IM, Grishin EV, Beadle DJ, King LA (1995) Functional characterization of black widow spider neurotoxins synthesised in insect cells. *Eur J Biochem* 230(3):854–859. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20628.x>
- Koller J, Sutter L, Gonthier J, Collatz J, Norgrove L (2023) Entomopathogens and Parasitoids Allied in Biocontrol: A Systematic Review. *Pathogens* 12:957. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070957>
- Kroemer JA, Bonning BC, Harrison RL (2015) Expression, delivery and function of insecticidal proteins expressed by recombinant baculoviruses. *Viruses* 7(1):422–455. <https://doi.org/10.3390/v7010422>
- Kumar, S.; Singh, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects (2015) *J Fertil Pestic* 6:1–2. <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000e129>
- Moscardi F (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 44: 257–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257>
- Rohou A, Nield J, Ushkaryov YA (2007) Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon* 49(4):531–549. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.021>
- Timofeev SA, Shukhalova AG, Senderskiy IV, Mtitina GV, Gannibal FB, Dolgikh VV (2024) Two insecticidal neurotoxins from parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* venom and their potential use in biocontrol. *BioControl* 69:65–75. <https://doi.org/10.1007/s10526-023-10238-x>
- Torres SL, Landeros A, Penhallegon EJ, Salazar K, Porter LM (2022) Expression of Brown and Southern Black Widow Spider (Araneae: Theridiidae) Latrotoxins Is Tissue- and Life Stage-Specific for α -Latroinsectotoxins and δ -Latroinsectotoxins and Is Ubiquitous for α -Latrotoxins. *J Med Entomol* 59(1):184–191. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab168>
- Wang X, Tang X, Xu D, Yu D (2019) Molecular basis and mechanism underlying the insecticidal activity of venoms and toxins from *Latrodectus* spiders. *Pest Manag Sci* 75(2):318–323. <https://doi.org/10.1002/ps.5206>
- Wang XC, Duan ZG, Yang J, Yan XJ, Zhou H, He XZ, Liang SP (2007) Physiological and biochemical analysis of *L. tredecimguttatus* venom collected by electrical stimulation. *J Physiol Biochem* 63(3):221–230. <https://doi.org/10.1007/BF03165785>

Translation of Russian References

- Dulubova IE, Khvotchev MV, Krasnoperov VG, Galkina TG, Pluzhnikov KA Volkova TM, Grishin EV (1996) Primary structure of delta-latroinsectotoxin from venom of the *Latrodectus mactans tredecimguttatus* spider. *Russ. J. Bioorg. Chem* 22(1):68–73

Plant Protection News, 2024, 107(3), p. 130–136

OECD+WoS: 1.06+QU (Microbiology), 2.08+DB (Biotechnology & Applied Microbiology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2024-107-3-16655>

Full-text article

SELECTION OF A Δ -LATROINSECTOTOXIN FRAGMENT FROM *LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS* VENOM FOR EFFICIENT BACTERIAL EXPRESSION

S.A. Timofeev^{1*}, A.G. Shukhalova¹, O.A. Pavlova^{1,2}

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: ts-bio@ya.ru

Toxins from the venom of predatory and parasitoid arthropods, such as scorpions, spiders, and parasitoid wasps, are used as promising tools in plant protection against insect pests. In many cases, polyclonal antibodies can be created to study a single molecule in the laboratory, which allows for specific methods of detection and purification. In the present study, heterologous expression of δ -latroinsectotoxin from the venom of the black widow spider *Latrodectus tredecimguttatus*, as well as its N- and C- terminal fragments, was carried out in *Escherichia coli* cells at various temperatures and aeration conditions. Regardless of the expression conditions, the accumulation of the recombinant protein in large quantities in the bacterial cells as inclusion bodies was observed only for the C-terminal fragment of the toxin. The high efficiency of expression of this fragment allowed the use of the insoluble protein fraction of the bacterial homogenate for the immunization of mice and the production of antibodies to δ -latroinsectotoxin. The antigen-binding activity of the immunoglobulins was confirmed by immunoblotting of the synthesized toxin fragment in bacteria using a vector with removed leader sequences. The antibodies obtained can be used to detect the black widow spider toxin during its expression in various systems, such as in the creation of genetically modified entomopathogenic fungi or viruses.

Keywords: biological plant protection, heterologous expression, polyclonal antibodies

Submitted: 13.08.2024

Accepted: 15.10.2024

ВИДОВОЙ СОСТАВ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В ПОСЕВАХ СОИ *GLYCINE MAX* В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОГО ЧЕРНОЗЕМЬЯ (НА ПРИМЕРЕ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ)

Н.Н. Лунева¹, Е.Н. Мыслик^{1*}, Т.И. Воронкина²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²ООО «Русагро-Инвест», Белгород

* ответственный за переписку, e-mail: vajra-sattva@yandex.ru

На основе данных мониторинга изучены сорные растения посевов сои в Белгородской области. Всего обнаружено 37 видов сорных растений, большинство из которых относятся к семействам *Compositae*, *Gramineae*, *Cruciferae*. Значение каждого вида в посевах сои оценивалось по его парциальной активности, которая определялась по результатам мониторинга на основе встречаемости и проективного покрытия. Наиболее высокие баллы парциальной активности получены для *Chenopodium album*, *Echinochloa crusgalli*, *Amaranthus retroflexus*, *Fallopia convolvulus* и щетинников *Setaria viridis* и *S. pumila*. Средние баллы парциальной активности отмечены для *Cirsium incanum*, *Persicaria hydropiper*, *Convolvulus arvensis*, *Solanum nigrum*, *Polygonum aviculare* s. str. и *Xanthium strumarium*. Около трети видов (13) в посевах сои – малоактивные: *Cyclachaena xanthiifolia*, *Sonchus arvensis*, *Euphorbia virgata*, *Descurainia sophia*, *Stachys annua*, *Artemisia vulgaris*, *Tripleurospermum inodorum*, *Lactuca serriola*, *Consolida regalis*, *Artemisia absinthium*, *Sonchus asper*, *Centaurea cyanus* и *Setaria italica*. Также зарегистрировано 12 неактивных видов с невысокими показателями проективного покрытия. Результаты исследования могут быть использованы для разработки региональной стратегии защиты посевов сои от сорных растений в Белгородской области.

Ключевые слова: соя, сорная флора, парциальная активность видов, фитосанитарная роль

Поступила в редакцию: 01.09.2024

Принята к печати: 05.11.2024

Введение

Соя *Glycine max* (L.) Merr. считается одной из ценных зернобобовых культур благодаря составу семян (17–26% жира, 36–48% белка, более 20% углеводов). Семена сои используются в пищевых, технических и кормовых целях. По качеству белка, приближающегося по биологической ценности к белкам животного происхождения, соя превосходит многие масличные и зерновые культуры (Соя, 2023).

Таким образом, проблема обеспечения продовольственным и кормовым белком Центрально-Черноземного региона (ЦЧР) может быть в значительной степени решена путем возделывания сои. В связи со значительными объемами производства мяса птицы и свинины в Белгородской области, значение этой культуры, как основного ингредиента при производстве комбикормов, чрезвычайно возрастает (Шевченко и др., 2008). Белгородская область лидирует в ЦЧР по валовым сборам сои (Белгородская область ... , 2021), посевные площади под этой культурой в регионе увеличиваются (Медведева, 2022; В Белгородской ... , 2023).

Одним из существенных факторов, влияющих на снижение урожая сои, является влияние сорных растений, вызывающее необходимость в разработке систем борьбы с ними во многих странах, где возделывается соя (Gal et al.,

2015; Ferreira et al., 2017; Sepata et al., 2017; Голубев, 2019; Satorre et al., 2020; Chetan et al., 2022). Обстановка с засоренностью посевов сои в Белгородской области, несмотря на проведение химических обработок, остается напряженной. Из обследованных специалистами Россельхозцентра в 2022 г. 186,72 тыс. га под посевами сои все были засорены, причем в значительной степени, со следующими количественными показателями по хозяйственно-биологическим группам сорных растений: «яровые ранние – 29 экз./м²; яровые поздние – 35 экз./м²; зимующие 2 экз./м²; двулетние – 2 экз./м²; стержнекорневые – 4 экз./м²; корнеотпрысковые – 4 экз./м²; корнеотпрысковые – 7 экз./м²» (Обзор ... , 2023, с. 44). Пороговые значения для видов сорных растений (экз./м²), при которых рекомендована обработка гербицидами («бодяк щетинистый – 1, осот полевой – 2, марь белая – 3, горчица полевая – 5, паслен черный – 2, виды щирицы – 4, виды щетинников – 8» (Обзор ... , 2023, с. 54)) позволяют оценить ситуацию с засоренностью как неблагоприятную.

Цель данного исследования – выявление видового состава сорных растений в посевах сои на территории Белгородской области, определение фитосанитарной роли отдельных видов.

Материалы и методы

Сорная флора формируется за счет видов растений как антропогенно, так и естественно нарушенных биотопов, что делает ее неотъемлемой частью региональной флоры

(Гроссгейм, 1948; Мальцев, 1962; Никитин, 1983; Ульянова, 2005; Лунева, 2021). Совокупность видов сорных растений в посевах сои может рассматриваться как пример

парциальной флоры, то есть флоры выравненного экотопа (Юрцев, 1974; Юрцев, Семкин, 1980).

Изучался видовой состав сорных растений в агрофитоценозах посевов сои на территории Белгородской области. Материалами для анализа послужили данные фитосанитарного мониторинга состояния посевов сои в 2021–2022 г., в ходе которого было обследовано 87 полей согласно методике геоботанического обследования посевов в отношении сорных растений (Лунева, 2009). Материалы были использованы для наполнения базы данных «Сорные растения полей Российской Федерации» (Мысник и др., 2021). Проведен флористический анализ (Толмачев, 1974). Ботаническая номенклатура приведена в соответствии с флористической сводкой П.Ф. Маевского (Маевский, 2014).

Значение видов сорных растений оценивалось путем определения их парциальной активности в агрофитоценозах посевов сои по методике Т.А. Палкиной (2015). Парциальная активность вида в формировании агроценозов в посевах одной культуры определялась с учетом двух показателей: постоянства встречаемости и среднего проективного покрытия этого вида в посевах данной культуры. В соответствии с названной методикой выделено 6 классов

постоянства встречаемости: I класс – вид встречается менее, чем в 10% описаний; II класс – вид встречается в 10–20% описаний; III класс – вид встречается в 21–40% описаний; IV класс – вид встречается в 41–60% описаний; V класс – вид встречается в 61–80% описаний; VI класс – вид встречается в 81–100% описаний. Классы обилия выделены по проективному покрытию вида в сообществах: 1 класс – единичные растения; 2 класс – обилие меньше 0.5%; 3 класс – обилие 0.5–1.0%; 4 класс – обилие 1.1–2.0%; 5 класс – обилие 2.1–5.0%; 6 класс – обилие более 5%. По сочетанию этих показателей сорно-полевые виды были разбиты Т.А. Палкиной на 6 категорий (1 – особоактивные, 2 – высокоактивные, 3 – среднеактивные, 4 – довольноактивные, 5 – малоактивные, 6 – неактивные) в соответствии со шкалой, приведенной в таблице 1 (Палкина, 2015).

С точки зрения защиты растений различение некоторых видов внутри рода не так важно, если они требуют одинаковых мер борьбы с ними (Шпанев, 2018; Соболева, Плотникова, 2018). Поэтому зарегистрированные в посевах сои щетинник зеленый *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. и щетинник низкий *Setaria pumila* (Poir.) Roem. et Schult. были объединены в группу «щетины».

Таблица 1. Баллы парциальной активности видов сорных растений в посевах культуры (по Палкиной, 2015)

Table 1. Partial activity scores of weed species in crops (according to Palkina, 2015)

Проективное покрытие, % [Projective cover, %]	Балл обилия [Abundance score]	Встречаемость, % [Occurrence, %]					
		81–100	61–80	41–60	21–40	10–20	<10
		Класс постоянства [Persistence class]					
		VI	V	IV	III	II	I
>5	6	1	1	2	3	4	5
2.1–5.0	5	2	2	3	4	4	5
1.1–2.0	4	2	2	3	4	4	5
0.5–1.0	3	3	3	4	5	5	5
<0.5	2	4	4	4	5	5	6
единично [single]	1	5	5	5	5	6	6

Результаты

В посевах сои в Белгородской области выявлено 37 видов сорных растений из 32 родов и 19 семейств (табл. 2).

Количество видов в семействах меняется от 1 до 11, наибольшую представленность по видам имеют семейства *Compositae*, *Gramineae*, *Cruciferae*. Количество родов в семействе изменяется от 1 до 8, наибольшую представленность по родам имеют семейства *Compositae*, *Cruciferae*. Количество видов в роде изменяется от 1 до 3. Один род представлен 3 видами (щетины *Setaria*), 3 рода – 2 видами (полынь *Artemisia*, латук *Lactuca*, осот *Sonchus*). Большинство семейств и родов представлено 1 видом.

Отметим, что три лидирующих (по количеству видов) семейства сорных растений в посевах сои (*Compositae*, *Gramineae*, *Cruciferae*), приводятся также в качестве лидирующих для сорных растений посевов пшеницы озимой в Белгородской области (Лунева и др., 2022), а также в составе сорной флоры агроландшафта Белгородской области в целом (Лунева и др., 2023).

Хозяйственное значение каждого вида сорного растения в посевах сои в значительной степени обусловлено его парциальной активностью: чем выше балл активности, тем выше значение вида, как вредного объекта (табл. 3)

По продолжительности жизни большинство видов (25 видов) входят в группу малолетников (одно- и двулетних видов). К многолетним относятся 12 видов (табл. 3).

В соответствии с агробиологической классификацией сорных растений (Фисюнов, 1984; Баздырев, 2004) наибольшую представленность в посевах сои имели яровые виды сорных растений (яровые ранние – 8 видов, яровые поздние – 7 видов). Зимующие сорные растения представлены 9 видами, корнеотпрысковые – 6 видами, стержнекорневые – 4 видами, корневищные – 2 видами, двулетние – 1 видом.

В посевах сои выявлен только один особоактивный вид – марь белая, отмеченный на подавляющем большинстве обследованных полей с высокими показателями обилия. Высокоактивные виды – ежовник обыкновенный, щирица назадзапрокинутая, гречишка вьюнковая и щетины (сизый и зеленый) – зарегистрированы на значительном количестве полей под посевами сои. Выявлен всего один среднеактивный вид – бодяк щетиный. Среди вышеперечисленных групп видов, отличающихся наибольшей парциальной активностью в посевах сои, все виды, за исключением корнеотпрыскового бодяка

Таблица 2. Таксономическая представленность сорных растений в посевах сои по семействам (Белгородская область, 2020–2021 гг.)**Table 2.** Taxon composition of weed families in soybean crops (Belgorod Region, 2020–2021)

Семейства [Families]	Количество видов в семействе [Number of species in the family]	Количество родов в семействе [Number of genera in the family]
Сложноцветные <i>Compositae</i>	11	8
Злаки <i>Gramineae</i>	4	2
Крестоцветные <i>Cruciferae</i>	4	4
Гречиховые <i>Polygonaceae</i>	3	3
Амарантовые <i>Amaranthaceae</i>	1	1
Зонтичные <i>Umbelliferae</i>	1	1
Кутровые <i>Apocynaceae</i> (incl. <i>Asclepiadaceae</i>)	1	1
Спаржевые <i>Asparagaceae</i>	1	1
Гвоздичные <i>Caryophyllaceae</i>	1	1
Маревые <i>Chenopodiaceae</i>	1	1
Вьюнковые <i>Convolvulaceae</i>	1	1
Хвощовые <i>Equisetaceae</i>	1	1
Молочайные <i>Euphorbiaceae</i>	1	1
Маковые <i>Papaveraceae</i> (incl. <i>Fumariaceae</i>)	1	1
Губоцветные <i>Labiatae</i>	1	1
Лютиковые <i>Ranunculaceae</i>	1	1
Норичниковые <i>Scrophulariaceae</i> s. l. (incl. <i>Orobanchaceae</i>)	1	1
Пасленовые <i>Solanaceae</i>	1	1
Фиалковые <i>Violaceae</i>	1	1

щетиного, являются яровыми (ранними и поздними) сорными растениями.

Пять довольноактивных видов могут быть разбиты на три группы: 1) вьюнок полевой, встреченный на 44.7% обследованных полей с проективным покрытием 0.84%; 2) дурнишник обыкновенный и горец перечный, зарегистрированные на 29.4–30.6% полей с показателями проективного покрытия 2.20–3.00%; 3) паслен черный и горец птичий, встреченные на 10.6–16.5% обследованных полей с показателями проективного покрытия 1.94–7.90%. То есть, в эту группу входят как виды, встреченные на значительном количестве полей, но с небольшим проективным покрытием, так и наоборот – виды, встреченные на небольшом количестве полей, но отличающиеся значительными показателями проективного покрытия. В этой группе все виды, за исключением корнеотпрыскового вьюнка полевого, являются яровыми ранними сорными растениями.

Малоактивных видов значительно больше – 13, и они также распределяются по трем группам: 1) циклахена

дурнишникolistная, осот полевой, молочай прутьевидный встречены на 22.35–32.94% обследованных полей с показателями проективного покрытия 0.72–0.88%; 2) дескурайния Софии, чистец однолетний, полынь обыкновенная, трехреберник непахучий, зарегистрированные на 11.8–16.5% обследованных полей с показателями проективного покрытия 0.39–0.85%; 3) латук компасный, сокирки великолепные, полынь горькая, осот шероховатый, василек синий, щетинник итальянский, зарегистрированные на 1.2–8.2% обследованных полей с показателями проективного покрытия 1.00–10.00%.

Выявлено примерно столько же неактивных видов (12), зарегистрированных на незначительном количестве полей и с очень невысокими показателями проективного покрытия: резак обыкновенный, хвощ полевой, пастушья сумка обыкновенная, ярутка полевая, дымянка лекарственная, сурепка дуговидная, льнянка обыкновенная, смолевка клейкая, спаржа лекарственная, латук татарский, ваточник сирийский, фиалка полевая.

Обсуждение

Для всей совокупности обследованных в 2020–2021 гг. посевов (без подразделения на культуры) на территории Белгородской области нами был выявлен 51 вид сорных растений (Лунева и др., 2023). Из них в посевах сои обнаружено 37 видов сорных растений, которые, за исключением ваточника сирийского, указаны во флористической сводке для региона (Еленевский и др., 2004). Возможно, имел место единичный занос ваточника сирийского с семенным материалом.

Сравнение показало, что виды, характеризующиеся высокой фитосанитарной значимостью (особо-, высоко-, средне- и довольноактивные) в посевах сои, также имеют значимые позиции для посевов региона в целом.

Так, в агрофитоценозах Белгородской области остаются довольноактивными видами горец птичий, горец перечный, паслен черный, дурнишник обыкновенный; особоактивным – марь белая, высокоактивным – гречишка вьюнковая. Ряд видов переходят в группы с более высокой активностью: среднеактивный бодяк седой становится особоактивным, довольноактивный вьюнок полевой – высокоактивным; высокоактивные щирца назадзапрокинутая, ежовник обыкновенный и группа видов щетинников (сизого и зеленого) – особоактивными.

Виды, малоактивные в посевах сои, входят в группу довольно- и среднеактивных в агрофитоценозах Белгородской области: дескурайния Софии, полынь обыкновенная, василек синий, молочай лозный, осот острый, латук

Таблица 3. Виды сорных растений и баллы их активности в посевах сои (Белгородская область, 2020–2021 гг.)

Table 3. Weed species and their activity scores in soybean crops (Belgorod Region, 2020–2021)

Название вида [Species name]	Встречаемость, % [Occurrence, %]	Класс постоянства встречаемости [Persistence class]	Проективное покрытие, % [Projective cover, %]	Класс обилия [Abundance class]	Баллы парциальной активности [Partial activity scores]	Продолжительность жизни [Life cycle]
<i>Setaria</i> spp. щетинники сизый и зеленый	95.29	VI	3.366	5	2	МА
<i>Amaranthus retroflexus</i> L. щирица назадзапрокинутая	88.24	VI	4.629	5	2	МА
<i>Chenopodium album</i> L. марь белая	82.35	VI	5.161	6	1	МА
<i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) Beauv. ежовник обыкновенный	71.76	V	2.953	5	2	МА
<i>Fallopia convolvulus</i> (L.) A. Löve гречишка вьюнковая	67.06	V	1.124	4	2	МА
<i>Convolvulus arvensis</i> L. вьюнок полевой	44.71	IV	0.839	3	4	МН
<i>Cirsium incanum</i> (S.G. Gmel.) Fisch. бодяк седой	43.53	IV	1.270	4	3	МН
<i>Cyclachaena xanthiifolia</i> (Nutt.) Fresen. циклахена дурнишниковлистная	32.94	III	0.875	3	5	МА
<i>Sonchus arvensis</i> L. осот полевой	31.76	III	0.719	3	5	МН
<i>Xanthium strumarium</i> L. дурнишник обыкновенный	30.59	III	3.023	5	4	МА
<i>Persicaria hydropiper</i> (L.) Delarbre горец перечный	29.41	III	2.164	5	4	МА
<i>Euphorbia virgata</i> Waldst. et Kit. молочай прутьевидный	22.35	III	0.879	3	5	МН
<i>Solanum nigrum</i> L. паслен черный	16.47	II	1.936	4	4	МА
<i>Descurainia sophia</i> (L.) Webb ex Prantl дескурайния Софии	16.47	II	0.389	2	5	МА
<i>Stachys annua</i> (L.) L. чистец однолетний	16.47	II	0.159	2	5	МА
<i>Artemisia vulgaris</i> L. полынь обыкновенная	15.29	II	0.846	3	5	МН
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch. Bip. трехреберник непахучий	11.76	II	0.760	3	5	МА
<i>Polygonum aviculare</i> L. s. str. горец птичий	10.59	II	7.889	6	4	МА
<i>Falcaria vulgaris</i> Bernh. резак обыкновенный	9.41	I	0.100	2	6	МН
<i>Lactuca serriola</i> L. латук дикий	8.24	I	1.729	4	5	МА
<i>Consolida regalis</i> S.F. Gray сокирки великолепные	8.24	I	2.071	5	5	МА
<i>Equisetum arvense</i> L. хвощ полевой	7.06	I	0.100	2	6	МН
<i>Artemisia absinthium</i> L. полынь горькая	5.88	I	2.080	5	5	МН
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. осот шероховатый	4.71	I	1.775	4	5	МА
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik. пастушья сумка обыкновенная	4.71	I	0.100	2	6	МА
<i>Thlaspi arvense</i> L. ярутка полевая	4.71	I	0.100	2	6	МА
<i>Fumaria officinalis</i> L. дымянка лекарственная	3.53	I	0.100	2	6	МА
<i>Barbarea arcuata</i> (Opiz ex J. et C Presl) Reichb. сурепка дуговидная	2.35	I	0.100	2	6	МН
<i>Linaria vulgaris</i> Mill. льнянка обыкновенная	2.35	I	0.100	2	6	МН
<i>Silene viscosa</i> (L.) Pers. смолевка клейкая	2.35	I	0.051	2	6	МА
<i>Asparagus officinalis</i> L. спаржа лекарственная	2.35	I	0.051	2	6	МН
<i>Centaurea cyanus</i> L. василек синий	1.18	I	10.000	6	5	МА
<i>Setaria italica</i> (L.) Beauv. щетинник итальянский	1.18	I	1.000	3	5	МА
<i>Lactuca tatarica</i> (L.) C.A. Mey. латук татарский	1.18	I	2.000	4	6	МН
<i>Asclepias syriaca</i> L. ваточник сирийский	1.18	I	0.100	2	6	МН
<i>Viola arvensis</i> Murray фиалка полевая	1.18	I	0.010	2	6	МН

Условные обозначения: МА – малолетние (одно- и двулетние) виды, МН – многолетние виды

компасный, циклахена дурнишниковлистная, чистец однолетний, полынь горькая – довольноактивные; осот полевой, трехреберник непахучий, сокирки великолепные – среднеактивные. Лишь щетинник итальянский становится неактивным.

Виды, неактивные в посевах сои, входят в группу мало- и довольноактивных в агрофитоценозах Белгородской области: льнянка обыкновенная, латук татарский, сурепка дуговидная, смолевка клейкая – малоактивные; хвощ

полевой, ярутка полевая, пастушья сумка обыкновенная, дымянка лекарственная, фиалка полевая, резак обыкновенный – довольноактивные. Лишь спаржа лекарственная и ваточник сирийский остаются неактивными.

В посевах сои не встречены 14 видов, отмеченных на других сегетальных местообитаниях Белгородской области (один довольно активный – мальва маленькая *Malva pusilla* Smith.; 6 малоактивных – смолевка обыкновенная *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, чина луговая *Lathyrus*

tuberosus L., горошек мышиный *Vicia cracca* L., метлица обыкновенная *Apera spica-venti* (L.) Beauv., овес пустой *Avena fatua* L. s. l., подмаренник цепкий *Galium aparine* L.; 7 неактивных видов – мелолепестник однолетний *Erigeron annuus* (L.) Pers., подсолнечник однолетний *Helianthus annuus* L., незабудка полевая *Myosotis arvensis* (L.) Hill., лебеда раскидистая *Atriplex patula* L., яснотка стеблеобъемлющая *Lamium amplexicaule* L., мятлик однолетний *Poa*

annua L., пырей ползучий *Elytrigia repens* (L.) Nevski).

Следовательно, посеы сои засорены, главным образом, видами такого же уровня активности, как и в посевах на территории Белгородской области в целом, что свидетельствует о единстве сорной флоры области, тем не менее количественные показатели обилия видов сорных растений в посевах во многом зависят от культуры и ее средообразующей роли (Марков, 1972).

Заключение

1. В посевах сои в Белгородской области выявлено 37 видов сорных растений, причем виды со значимой парциальной активностью оказались теми же, что и в агроценозах области в целом, что доказывает единство сорной флоры региона.

2. Виды сорных растений, входящие в группы с более высокой парциальной активностью (особоактивные, высокоактивные, среднеактивные, довольноактивные) относятся к яровым ранним и поздним (9 видов) и корнеотпрысковым (2 вида) сорным растениям.

3. Ожидается, что наиболее вредоносными в посевах сои, благодаря высокой парциальной активности, будут следующие виды: марь белая, ежовник обыкновенный, щирица назадзапрокинутая, гречишка вьюнковая и щетинники (сизый и зеленый).

4. Не менее, чем на половине полей под посевами сои ожидается присутствие бодяка седого. Довольно активно проявят себя на значительном количестве полей со средним и низким уровнем обилия вьюнок полевой,

дурнишник обыкновенный и горец перечный, а также паслен черный и горец птичий – но на небольшом количестве полей при высоком уровне обилия.

5. На третьей части полей под посевами сои ожидается присутствие 13 малоактивных видов: циклахена дурнишниковидная, осот полевой, молочай прутьевидный, дескурайния Софии, чистец однолетний, полынь обыкновенная, трехреберник непахучий, латук компасный, сокирки великолепные, полынь горькая, осот шероховатый, василек синий, щетинник итальянский.

6. Число видов из группы неактивных в посевах сои наиболее волатильно и может как уменьшиться (из-за выпадения неактивных в посевах области ваточника сирийского и спаржи лекарственной или из-за перехода неактивных в посевах сои видов в разряд мало- и довольно активных, как в области в целом), так и увеличиться, поскольку эта группа постоянно пополняется видами рудеральной флоры и флоры естественных нарушенных местообитаний (Лунева, 2021).

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания согласно бюджетному проекту ВИЗР по теме № FGEU-2022-0002 «Цифровизация, картирование, мониторинг и прогноз в области изучения биоразнообразия агроландшафтов и агроэкосистем с учетом новых угроз».

Библиографический список (References)

- Баздырев ГИ (2004) Защита сельскохозяйственных культур от сорных растений. М.: КолосС. 328 с.
- Белгородская область лидирует по валовым сборам сои в ЦФО. Зерно Он-Лайн (2021) <https://www.zol.ru/n/34d28> (12.09.2024)
- В Белгородской области подсолнечником и соей засеют почти 500 тыс. га. OleoScope (2023) <https://oleoscope.com/news/v-belgorodskoj-oblasti-podsolnechnikom-i-soej-zasejut-pochti-500-tys-ga/?ysclid=lfsgj2v15144840751> (12.09.2024)
- Голубев АС (2019) Изучение эффективности применения нового гербицида Бенито на посевах сои *Вестник защиты растений* 4(102):54–59. <http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-4-102-54-59>
- Гроссгейм АА (1948) Растительный покров Кавказа. М.: Изд-во МОИП. 265 с.
- Еленевский АГ, Радыгина ВИ, Чаадаева НН (2004) Растения Белгородской области. (Конспект флоры). М.: Моск. гос. пед. ун-т. 120 с.
- Лунева НН (2021) Сорные растения и сорная флора как основа фитосанитарного районирования (обзор). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции* 2(182):139–150. <http://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-2-139-150>
- Лунева НН (2009) Технологические методы учета и мониторинга сорных растений в агроэкосистемах. Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга. СПб.: ВИЗР. С. 39–56.
- Лунева НН, Мысник ЕН, Воронкина ТИ (2022) Засоренность посевов пшеницы озимой (*Triticum aestivum* L.) в Белгородской области. *Полевой журнал биолога* 4(3):183–198. <http://doi.org/10.52575/2712-9047-2022-4-3-183-198>
- Лунева НН, Мысник ЕН, Воронкина ТИ, Третьякова АС (2023) Таксономическая и биоэкологическая структура сорной флоры агроландшафта Белгородской области. *Известия Воронежского отделения Русского ботанического общества* 10:32–47
- Маевский ПФ (2014) Флора средней полосы европейской части России. М.: Тов-во науч. изд. КМК. 635 с.
- Мальцев АИ (1962) Сорная растительность СССР и меры борьбы с ней. М.; Л.: Сельхозгиз. 271 с.
- Марков МВ (1972) Агрофитоценология – наука о полевых растительных сообществах. Казань: Казан. гос. ун-т. 272 с.
- Медведева А (2022) Увеличить площади под соей в 2023 году в Белгородской области поручил Дмитрий Патрушев. АГРОXXI. Агропромышленный портал. <https://www.agroxxi.ru/rossiiskie-agronovosti/uvelichit-ploschadi-pod-soei-v-2023-godu-v-belgorodskoi-oblasti-poruchil-dmitrii-patrushev.html?ysclid=lfsi9oocv281104152> (12.09.2024)

- Мысник ЕН, Лунева НН, Соколова ТД, Надточий ИН (2021). Сорные растения полей Российской Федерации». Свидетельство о регистрации базы данных № 2021522847
- Никитин ВВ (1983) Сорные растения флоры СССР. Л.: Наука. 454 с.
- Палкина ТА (2015) Структура сеgetальной флоры Рязанской области. *Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета имени П.А. Костычева* 27(3):26–32
- Севальнев АА, ред (2023) Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в Белгородской области в 2022 году и прогноз развития вредных объектов в 2023 году. Белгород: ООО «ЛитКараВан». 139 с.
- Соболева ЛМ, Плотникова ТВ (2018) Борьба с сорной растительностью при выращивании рассады табака с помощью гербицидов Стомп и Комманд. *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета* 53:33–38
- Соя. Агро Эксперт Групп. Культуры (2023) <https://agroex.ru/culture/soya/> (12.09.2024)
- Толмачев АИ (1974) Введение в географию растений. Л.: ЛГУ. 244 с.
- Ульянова ТН (2005) Сорные растения во флоре России и сопредельных государств. Барнаул: Азбука. 297 с.
- Фисюнов АВ (1984) Сорные растения. М.: Колос. 320 с.
- Шевченко НС, Зеленская И., Закурдаева НН (2008) Производство сои в Белгородской области. *Достижения науки и техники АПК* 6:38–40
- Шпанев АМ (2018) Вредоносность сорных растений в посевах пшеницы озимой на Северо-Западе России. *Вестник защиты растений* 2(96):42–46
- Юрцев БА (1974) Дискуссия на тему «Метод конкретных флор в сравнительной флористике». *Ботанический журнал* 59(9):1399–1407
- Юрцев БА, Семкин БИ (1980) Изучение конкретных и парциальных флор с помощью математических методов. *Ботанический журнал* 65(12):1706–1718
- Chetan F, Rusu T, Chetan C, Urdă C et al (2022) Influence of soil tillage systems on the yield and weeds infestation in the soybean crop. *Land* 11(10):1708. <https://doi.org/10.3390/land11101708>
- Ferreira AS, Freitas DM, Silvaa GG, Pistorib H et al (2017) Weed detection in soybean crops using ConvNets. *Computers and Electronics in Agriculture* 143:314–324. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.10.027>
- Gal J, Afifi M, Lee E, Lukens L et al (2015) Detection of neighboring weeds alters soybean seedling roots and nodulation. *Weed Science* 63(4):888–900. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00039.1>
- Satorre EH, Fuente EB, Mas MT, Suarez SA et al (2020) Crop rotation effects on weed communities of soybean (*Glycine max* L. Merr.) agricultural fields of the Flat Inland Pampa. *Crop Protection* 130:105068. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105068>
- Sepata S, Thierfelderb Ch, Sharmaa AR, Pavuluric K et al (2017) Effects of weed control strategy on weed dynamics, soybean productivity and profitability under conservation agriculture in India. *Field Crops Research* 210:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.05.017>

Translation of Russian References

- Bazdyrev GI (2004) [Protection of crops from weeds]. Moscow: KolosS. 328 pp.
- Chetan F, Rusu T, Chetan C, Urdă C et al (2022) Influence of soil tillage systems on the yield and weeds infestation in the soybean crop. *Land* 11(10):1708. <https://doi.org/10.3390/land11101708>
- Ferreira AS, Freitas DM, Silvaa GG, Pistorib H et al (2017) Weed detection in soybean crops using ConvNets. *Computers and Electronics in Agriculture* 143:314–324. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.10.027>
- Fisunov AV (1984) [Weeds]. Moscow: Kolos. 320 pp.
- Gal J, Afifi M, Lee E, Lukens L et al (2015) Detection of neighboring weeds alters soybean seedling roots and nodulation. *Weed Science* 63(4):888–900. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00039.1>
- Golubev AS (2019) [Study of the efficiency of a new herbicide Benito on soybeans]. *Plant Protection News* 4(102):54–59. <http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-4-102-54-59> (In Russian)
- Grossgeym AA (1948) [Vegetation cover of the Caucasus]. Moscow: Izd-vo MOIP. 265 pp. (In Russian)
- [In the Belgorod region, almost 500 thousand hectares will be sown with sunflower and soybeans. OleoScope] (2023) <https://oleoscope.com/news/v-belgorodskoj-oblasti-podsolnechnikom-i-soej-zasejut-pochti-500-tysga/?ysclid=lfsgij2v15144840751> (12.09.2024) (In Russian)
- Luneva NN (2009) [Technological methods of accounting and monitoring weeds in agroecosystems]. Vysokoproizvoditelnye i vysokotochnye tekhnologii i metody fitosanitarnogo monitoringa. St.Petersburg: VIZR. 39–56 (In Russian)
- Luneva NN (2021) [Weeds and weed flora as the basis for phytosanitary zoning (a review)]. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding* 2(182):139–150. <http://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-2-139-150> (In Russian)
- Luneva NN, Mysnik EN, Voronkina TI (2022) [Weediness of winter wheat crops (*Triticum aestivum* L.) in Belgorod Region (Russia)]. *Polevoy zhurnal biologa* 4(3):183–198. <http://doi.org/10.52575/2712-9047-2022-4-3-183-198> (In Russian)
- Luneva NN, Mysnik EN, Voronkina TI, Tretiyakova AS (2023) [Taxonomic and bioecological structure of the weed flora of the agro-landscape of the Belgorod region]. *Izvestiya Voronezhskogo otdeleniya Russkogo botanicheskogo obshchestva* 10:32–47 (In Russian)
- Maltsev AI (1962) [Weed vegetation of the USSR and measures to control it]. Moscow; Leningrad: Selkhozgiz. 271 pp. (In Russian)
- Markov MV (1972) [Agrophytocenology – the science of field plant communities]. Kazan: Kazan. gos. un-t. 272 pp. (In Russian)
- Mayevskiy PF (2014) [Flora of the middle belt of the European part of Russia]. Moscow: Tov-vo nauch. izd. KMK. 635 pp. (In Russian)
- Medvedeva A (2022) [Dmitry Patrushev instructed to increase the area under soybeans in 2023 in the Belgorod region.

- AGROXXI. Agro-industrial portal]. <https://www.agroxxi.ru/rossiiskie-agronovosti/uvlechit-ploschadi-pod-soeiv-2023-godu-v-belgorodskoi-oblasti-poruchil-dmitrii-patrushev.html?ysclid=lfsl9oocv281104152> (12.09.2024) (In Russian)
- Mysnik EN, Luneva NN, Sokolova TD, Nadtochiy IN (2021) Weeds of the fields of the Russian Federation. Database registration certificate № 2021522847 (In Russian)
- Nikitin VV (1983) [Weeds of the flora of the USSR]. Leningrad: Nauka. 454 p. (In Russian)
- Palkina TA (2015) [The structure of the segetal flora of the Ryazan region]. *Vestnik Ryazanskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta imeni P. A. Kostycheva* 27(3):26–32 (In Russian)
- Satorre EH, Fuente EB, Mas MT, Suarez SA et al (2020) Crop rotation effects on weed communities of soybean (*Glycine max* L. Merr.) agricultural fields of the Flat Inland Pampa. *Crop Protection* 130:105068. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105068>
- Sepata S, Thierfelder Ch, Sharma AR, Pavuluric K et al (2017) Effects of weed control strategy on weed dynamics, soybean productivity and profitability under conservation agriculture in India. *Field Crops Research* 210:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.05.017>
- Sevalnev AA, ed (2023) [Overview of the phytosanitary state of agricultural crops in the Belgorod region in 2022 and the forecast for the development of harmful objects in 2023]. Belgorod: OOO «LitKaraVan». 139 pp. (In Russian)
- Shevchenko NS, Zelenskaya TI, Zakurdayeva NN (2008) Soybean production in the Belgorod region. *Dostizheniya nauki I tekhniki APK* 6:38–40 (In Russian)
- Shpanev AM (2018) [Harmfulness of weed plants in winter wheat crops in the north-west of Russia]. *Plant Protection News* 2(96):42–46 (In Russian)
- Soboleva LM, Plotnikova TV (2018) [Weed control in growing tobacco seedlings with Stomp and Command herbicides]. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 53:33–38 (In Russian)
- Soybeans. Agro Expert Group. Cultures. (2023) <https://agroex.ru/culture/soya/> (12.09.2024) (In Russian)
- [The Belgorod region leads in gross soybean harvest in the Central Federal District. Grain On-Line] (2021) <https://www.zol.ru/n/34d28> (12.09.2024) (In Russian)
- Tolmachev AI (1974) [Introduction to plant geography]. Leningrad: LGU. 244 pp. (In Russian)
- Ulyanova TN (2005) [Weeds in the flora of Russia and neighboring states]. Barnaul: Azbuka. 297 pp. (In Russian)
- Yelenevskiy AG, Radygina VI, Chaadayeva NN (2004) [Plants of the Belgorod region. (Summary of flora)]. Moscow: Mosk. gos. ped. un-t. 120 pp. (In Russian)
- Yurtsev BA (1974) [Discussion on “Method of specific floras in comparative floristics”]. *Botanicheskii zhurnal* 59(9):1399–1407 (In Russian)
- Yurtsev BA, Semkin BI (1980) [Study of local and partial floras by mathematical methods]. *Botanicheskii zhurnal* 65(12):1706–1718 (In Russian)

Plant Protection News, 2024, 107(3), p. 137–143

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2024-107-3-16683>

Full-text article

SPECIES COMPOSITION OF WEEDS IN SOYBEAN *GLYCINE MAX* CROPS IN THE BELGOROD REGION

N.N. Luneva¹, E.N. Mysnik^{1*}, T.I. Voronkina²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²LLC «Rusagro-Invest», Belgorod, Russia

*corresponding author, e-mail: vajra-sattva@yandex.ru

The weed species were studied based on monitoring data in soybean crops in the Belgorod region. A total of 37 species of weed plants were found, most of which belong to the families of *Compositae*, *Gramineae*, and *Cruciferae*. The significance of each species in soybean crops was evaluated on its partial activity, which was determined based on both its occurrence and projective cover. *Chenopodium album*, *Echinochloa crusgalli*, *Amaranthus retroflexus*, *Fallopia convolvulus* and two *Setaria* species (*S. viridis* and *S. pumila*) demonstrated the highest scores of partial activities. *Cirsium incanum*, *Persicaria hydropiper*, *Convolvulus arvensis*, *Solanum nigrum*, *Polygonum aviculare* s. str., *Xanthium strumarium* were shown to have rather high scores of partial activities. About a third of species (13) are low-active: *Cyclachaena xanthiifolia*, *Sonchus arvensis*, *Euphorbia virgata*, *Descurainia sophia*, *Stachys annua*, *Artemisia vulgaris*, *Tripleurospermum inodorum*, *Lactuca serriola*, *Consolida regalis*, *Artemisia absinthium*, *Sonchus asper*, *Centaurea cyanus*, *S. italica*. Twelve weed species were rated as inactive in soybean crops of the Belgorod region. The results of the study may be used to develop a regional strategy for protecting soybean crops from weeds in the Belgorod region.

Keywords: soybean, weed flora, species activity, phytosanitary role

Submitted: 01.09.2024

Accepted: 05.11.2024

ПАМЯТИ ОЛЕГА ВЕНИАМИНОВИЧА СУНДУКОВА**IN MEMORY OF OLEG V. SUNDUKOV**

В 24 июля 2024 г. на восемьдесят восьмом году ушел из жизни Олег Вениаминович Сундуков, известный энтомолог, кандидат биологических наук, связавший всю свою научную деятельность с Всероссийским научно-исследовательским институтом защиты растений.

Сундуков О.В. после окончания Ленинградского Государственного Университета им. А.А. Жданова поступил в 1963 г. на заочное отделение аспирантуры ВИЗР, с 1964 по 1966 г. обучался в очной аспирантуре. После окончания аспирантуры в ноябре 1966 г. был зачислен в ВИЗР младшим научным сотрудником, с декабря 1982 г. до последних дней работал в должности старшего научного сотрудника института.

Все годы работы в ВИЗР Олег Вениаминович изучал вопросы физиолого-биохимических механизмов избирательного действия инсекто-акарицидов и формирования резистентности вредителей к применяемым токсикантам. Им были получены материалы, касающиеся процессов патогенеза при отравлении насекомых инсектицидами и роли ферментов карбоксилэстеразного комплекса в этих процессах, разработаны методы идентификации электрофоретически разделяемых фракций множественных молекулярных форм подкласса карбоксилэстераз, а также физиологического тестирования действия биологически активных веществ на транспорт электролитов в экскреторной системе насекомых. Результаты этих работ запатентованы. Олег Вениаминович участвовал в комплексных исследованиях института по линии СЭВ, а также со специалистами ИНЭОС им А.Н. Несмеянова и ИЭФиБ им. И.М. Сеченова РАН.

В 1990–2000 гг. О.В. Сундуковым был выполнен цикл работ, связанных с селекцией гомозиготных линий обыкновенного паутиного клеща по признаку чувствительности или резистентности к современным акарицидам из разных химических классов. В результате гибридологического анализа этих линий были определены типы детерминации признака резистентности к различным токсикантам (диметоат, малатион, бифентрин, бромпропилат, абамектин). Полученные материалы освещены в соответствующих главах монографии «Этиология острой токсичности инсектоакарицидов и физиологические факторы, определяющие избирательность их действия на членистоногих» (СПб, «Наука», 2012 г.).

В последние годы исследования О.В. Сундукова были посвящены особенностям чередования акарицидов из разных химических классов, обеспечивающего длительность их эффективного использования в системах ротации. Эти данные имеют большое практическое значение при разработке таких систем в борьбе с развитием резистентности в популяциях вредителей.

В памяти коллег и друзей Олег Вениаминович навсегда останется талантливым экспериментатором и увлеченным исследователем механизма токсического действия пестицидов на вредных членистоногих.

Научное издание

Индекс ПМ790

Подписано к печати 19 ноября 2024 г.

Формат 60x84/8. Объем 5 п.л. Тираж 200 экз.

Индекс ПМ790