

Оценка применимости классических и молекулярных методов диагностики возбудителя *Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker в лабораторных условиях

А.В. КАМЧЕНКОВ¹, Ю.В. ЦВЕТКОВА²,
А.А. КУЗНЕЦОВА³, И.П. ДУДЧЕНКО⁴, Г.Р. УСМАНОВА⁵

^{1, 2, 3, 4} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева», г. Москва, Россия

¹ e-mail: akamchenkov@mail.ru

² ORCID 0000-0002-4334-9224, e-mail: yutska@mail.ru

³ ORCID 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru

⁴ ORCID 0000-0003-0169-414X, e-mail: irinafito129@mail.ru

⁵ e-mail: gulnaz.usmanova005@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Возбудитель пятнистости листьев кукурузы *Cochliobolus carbonum* R.R. Nelson (= *Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker) – карантинный вредный организм для Российской Федерации и ряда других стран, способный инфицировать не только злаковые культуры, но и другие сельскохозяйственные растения. Вид распространен во многих регионах возделывания кукурузы на всех континентах, обладает высокой вредоносностью при определенных условиях окружающей среды, вызывая массовые эпифитотии и тяжелые поражения культурных растений. Ввозимая подкарантинная семенная продукция растений кукурузы (*Zea mays* L.) несет высокий фитосанитарный риск проникновения инвазивных видов на территорию РФ и их распространения на ней. Поэтому своевременная диагностика, основанная на правильном подходе применения методов выявления и идентификации карантинных вредных организмов, является важным критерием микологических исследований. В статье представлены данные о видах рода *Cochliobolus*, выявленных из подкарантинного материала растений кукурузы в ходе лабораторных исследований за период 2017–2021 гг. Проведена апробация метода классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением видоспецифичных праймеров (Bz-F/Bz-R), разработанных Kang et al. В ходе исследований определены рабочие критерии, по которым установлено, что изучаемая тест-система характеризуется высокой аналитической чувствительностью и специфичностью и применима для проведения лабораторного исследования карантинного вида *B. zeicola* в поступающей

Evaluation of the applicability of classical and molecular methods for diagnosing the phytopathogen *Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker in laboratory conditions

A.V. KAMCHENKOV¹, YU.V. TSVETKOVA²,
A.A. KUZNETSOVA³, I.P. DUDCHENKO⁴,
G.R. USMANOVA⁵

^{1, 2, 3, 4} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIICR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

¹ e-mail: akamchenkov@mail.ru

² ORCID 0000-0002-4334-9224, e-mail: yutska@mail.ru

³ ORCID 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru

⁴ ORCID 0000-0003-0169-414X, e-mail: irinafito129@mail.ru

⁵ e-mail: gulnaz.usmanova005@mail.ru

ABSTRACT

Leaf blight of maize *Cochliobolus carbonum* R.R. Nelson (= *Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker) is a quarantine pest for the Russian Federation and some other countries, capable of infecting not only cereals, but also other agricultural plants. The species is spread in many regions of corn cultivation on all continents, has a high harmfulness under certain environmental conditions, causing massive epiphytotic and severe damage to cultivated plants. Imported regulated seed products of corn plants (*Zea mays* L.) poses a high phytosanitary risk of introduction of invasive species into the Russian Federation and their spread within it. Therefore, timely diagnosis, based on the correct approach to the application of methods for the detection and identification of quarantine pests, is an important criterion for mycological research. The article presents data on the species of the genus *Cochliobolus* detected from regulated corn plants in the course of laboratory studies for the period 2017–2021. The classical polymerase chain reaction (PCR) method was tested using species-specific primers (Bz-F/Bz-R) developed by Kang et al. In the course of the research, working criteria were determined, according to which it was found that the test system under study is characterized by high analytical sensitivity and specificity and is applicable for laboratory testing of the quarantine species *B. zeicola* in incoming regulated corn plants. The article also describes the classical cultural and morphological methods for identifying the

подкарантинной продукции растений кукурузы. Также в статье описаны классические культурально-морфологические методы идентификации вида *B. zeicola*, проведен генетический анализ изолятов по участку внутреннего транскрибируемого спейсера ITS4-5, 8S-ITS5. Приведен сравнительный морфологический анализ целевого и близкородственных видов, встречающихся на растениях кукурузы.

Ключевые слова. Пятнистость листьев кукурузы, фитопатоген, выявление и идентификация, ПЦР, аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель пятнистости листьев кукурузы *Cochliobolus carbonum* R.R. Nelson (*Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker – анаморфа) является карантинным вредным организмом, отсутствующим на территории Российской Федерации. Данный вид широко распространен по всему миру, есть сообщения о его обнаружении в Австралии, Бразилии, Канаде, Китае, Конго, Австрии, Египте, Индии, Кении, Новой Зеландии, Нигерии, на Соломоновых Островах и в США (gd.eppo.int). По мнению многих ученых, патоген является одним из самых агрессивных представителей рода *Cochliobolus* (Manamgoda et al., 2014). Согласно современной систематике, грибы, ранее принадлежавшие к одному роду *Cochliobolus* с анаморфной стадией *Helminthosporium*, реклассифицированы в разные группы. Так, анаморфная стадия карантинного объекта, о котором идет речь в данной статье, называется *Bipolaris zeicola*, и данное название является предпочтительным. В таблице 1 указаны текущие названия возбудителей и часто встречающиеся синонимы, которые также включают прежние названия (speciesfungorum.org).

Хотя основным растением-хозяином является кукуруза (*Zea mays*), патоген поражает и других представителей семейства Злаковые (Poaceae), таких как сорго (*Sorghum* spp.), рис посевной (*Oryza sativa* L.), ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.), пшеница (*Triticum* spp.), рожь посевная (*Secale cereale* L.) гречка (*Paspalum* spp.), щетинник (*Setaria* spp.), полевика (*Eragrostis* spp.), а также незлаковые культуры – яблоню домашнюю (*Malus domestica* Borkh. (Rosaceae)) и кофе арабийский (*Coffea arabica* L. (Rubiaceae)) (Cipollone et al., 2020). В 2018 г. в Египте были обнаружены посевы риса, пораженные *B. zeicola*, вызвавшим гниение и гибель сеянцев риса. Выделенные из зараженной рассады изоляты, при различных уровнях патогенности, обладали высокой вирулентностью, поражая до 56% проростков риса. Установлено, что зараженные семена являются основным способом распространения инфекции, вызванной возбудителем *B. zeicola* (Rabie et al., 2018). Поэтому, вероятно, полный круг растений – хозяев этого патогена до конца еще не определен.

B. zeicola species, carried out a genetic analysis of the isolates in the region of the internal transcribed spacer ITS4-5, 8S-ITS5. A comparative morphological analysis of the target and closely related species occurring on corn plants is given.

Key words. Leaf blight of maize, phytopathogen, detection and identification, PCR, analytical sensitivity, analytical specificity.

INTRODUCTION

C*ochliobolus carbonum* R.R. Nelson (*Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker – anamorph) is a quarantine pest, absent in the Russian Federation. This species is widely spread throughout the world, there are reports of its detection in Australia, Brazil, Canada, China, Congo, Austria, Egypt, India, Kenya, New Zealand, Nigeria, Solomon Islands and USA (gd.eppo.int). According to many scientists, the pathogen is one of the most aggressive representatives of the genus *Cochliobolus* (Manamgoda et al., 2014). According to modern taxonomy, fungi that previously belonged to the same genus *Cochliobolus* with anamorphic stage *Helminthosporium*, were reclassified into different groups. So, the anamorphic stage of the quarantine pest under discussion, is called *Bipolaris zeicola*, and this name is preferred. Table 1 lists the current names of pathogens and frequently occurring synonyms, which also include former names (speciesfungorum.org).

Although the main host plant is maize (*Zea mays*), the pathogen also infects other members of the family Poaceae, such as *Sorghum* spp., *Oryza sativa* L., *Hordeum vulgare* L., *Triticum* spp., *Secale cereale* L., *Paspalum* spp., *Setaria* spp., *Eragrostis* spp., as well as non-cereals – *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) and *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) (Cipollone et al., 2020). In 2018, in Egypt, there were detected rice crops affected by *B. zeicola*, causing rot and death of rice seedlings. Isolates from infected seedlings, at various levels of pathogenicity, had high virulence, affecting up to 56% of rice seedlings. It has been established that infected seeds are the main pathway for the infection caused by the pathogen *B. zeicola* (Rabie et al., 2018). Therefore, it is likely that the full range of plant hosts of this pathogen has not yet been fully determined.

The disease was first detected and described by the American scientist A.J. Ullstrup on corn crops in Indiana, USA in 1938 (Ullstrup, 1944). In 1943–1947, due to favorable weather conditions, the disease spread widely to the eastern states of the United States, and later appeared in the northern part of the corn belt of the

Таблица 1
Названия грибов рода *Cochliobolus*
Table 1
Genus *Cochliobolus* fungi names

№ п/п	Текущее общепринятое название Current common name	Синонимы Synonyms
1	<i>Bipolaris zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker, 1959	<i>Helminthosporium zeicola</i> G.L. Stout, 1930, <i>Cochliobolus carbonum</i> R.R. Nelson, 1959
2	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (Drechsler) Drechsler, 1934	<i>Helminthosporium maydis</i> Y. Nisik. & C. Miyake, 1926, <i>Bipolaris maydis</i> (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker, 1959
3	<i>Bipolaris sorokiniana</i> Shoemaker, 1959	<i>Helminthosporium sorokinianum</i> Sacc., 1891, <i>Helminthosporium sativum</i> Pammel, C.M. King & Bakke, 1910, <i>Cochliobolus</i> <i>sativus</i> (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur, 1942
4	<i>Exserohilum turcicum</i> (Pass.) K.J. Leonard & Suggs, 1974	<i>Helminthosporium turcicum</i> Pass., 1876, <i>Bipolaris turcica</i> (Pass.) Shoemaker, 1959
5	<i>Bipolaris zeae</i> Sivan., 1985	<i>Cochliobolus zeae</i> H.S. Chang, 1992
6	<i>Cochliobolus bicolor</i> A.R. Paul & Parbery, 1966	<i>Bipolaris bicolor</i> (Mitra) Shoemaker 1959, <i>Helminthosporium bicolor</i> Mitra, 1930

Впервые заболевание было обнаружено и описано американским ученым А.Дж. Уллstrup на посевах кукурузы в штате Индиана в США в 1938 г. (Ullstrup, 1944). В 1943–1947 гг. из-за благоприятных погодных условий болезнь широко распространилась в восточные штаты США, а позже проявилась и в северной части кукурузного пояса страны. Впоследствии с зараженными семенами возбудитель распространился в регионы возделывания кукурузы и отмечался на всех континентах.

В России и на территории бывшего СССР патоген неоднократно обнаруживался на растениях кукурузы, выращенных из импортных семян. По сообщениям М.Ф. Боровской и В.Г. Матичука, в Молдавии это заболевание было отмечено в 1976 г., а на территории Западной Украины этот грибок был выявлен раньше (Боровская, Матичук, 1990). К 1990 г., по информации ВНИТИКиЗР, в СССР было зарегистрировано 44 очага гельминтоспориозной пятнистости листьев кукурузы. В основном ареал заболевания охватывал центральную часть Северного Кавказа, Западную Грузию, Западную Украину и Молдавию. Непосредственно в России в 1978 и 2002 гг. возбудителя пятнистости листьев кукурузы выявляли на отдельных участках Северного Кавказа и Приморского края (Александров, 1992; Мартынюк, 2003).

Однако в 2018 г., по данным Справочника по карантинному фитосанитарному состоянию территорий государств – участников СНГ на 01.01.2018, ни одного очага заболевания, вызванного возбудителем *B. zeicola*, на территории России зафиксировано не было (vniikr.ru). Дело в том, что *B. zeicola*, в отличие от таких возбудителей, как *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., относится к группе факультативных паразитов с недостаточно развитой приспособленностью к изменяющимся факторам внешней среды и условиям питания. Недостаточная пластичность и своеобразные экологические требования возбудителей группы *Cochliobolus* не позволяют им

country. Subsequently, with infected seeds, the pathogen spread to the regions of corn cultivation and was noted on all continents.

In Russia and on the territory of the former USSR, the pathogen has repeatedly been detected on corn plants grown from imported seeds. According to M.F. Borovskoy and V.G. Matichuk, in Moldova this disease was reported in 1976, and on the territory of Western Ukraine this fungus was reported earlier (Borovskaya, Matichuk, 1990). By 1990, according to VNIITIKiZR, 44 outbreaks of Northern Corn Leaf Blight (NCLB) in corn were reported in the USSR. Basically, the area of the disease covered the central part of the North Caucasus, Western Georgia, Western Ukraine and Moldova. Directly in Russia in 1978 and 2002, causative agent of leaf blight of maize was detected in certain areas of the North Caucasus and Primorsky Krai (Aleksandrov, 1992; Martynyuk, 2003).

However, in 2018, according to the Directory of Quarantine Phytosanitary Status of the Territories of the CIS Member States as of 01/01/2018, not a single outbreak of the disease caused by the pathogen *B. zeicola* was reported in Russia (vniikr.ru). In fact, *B. zeicola*, unlike pathogens such as *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., belongs to the group of facultative parasites with insufficiently developed adaptability to changing environmental factors and nutritional conditions. Insufficient plasticity and peculiar ecological requirements of pathogens of the *Cochliobolus* group do not allow them to survive in areas that differ from their natural habitats, accumulate the necessary amount of infectious agent for an outbreak and spread of the disease to new territories.

Thus, at the Wheat for the National Warm Areas conference held in Brazil in 1990, *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, belonging to the same genus as *B. zeicola*, was recognized as the most economically important leaf pathogen of wheat, but only for regions with a warm climate, for example, for Bangladesh, Brazil, India, Nepal, etc. (Manamgoda et al., 2011). As a rule, pathogens of this group, if they do not find suitable conditions, are localized in the places of importation or detection of the primary outbreak. Also, if they are detected long ago enough, then, limited to certain climatic zones and range of host plants, these pathogens do not spread to new areas. Being facultative parasites, they can remain in the plant for some time without causing disease, subsequently manifesting themselves as hemibiotrophs. The beginning of the manifestation of the parasitic properties of these pathogens can also serve as a weakening of the plant's immunity caused by damage to other pathogens, such as *Bipolaris maydis* or *Bipolaris turcica*. Therefore, *B. zeicola* often occurs in combination with the above species on affected plants.

выживать в районах, отличающихся от условий их естественного обитания, накапливать необходимое количество инфекционного начала для вспышки и распространения заболевания на новые территории.

Так, на конференции Wheat for the National Warm Areas, состоявшейся в Бразилии в 1990 г., *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, относящийся к тому же роду, что и *B. zeicola*, был признан наиболее экономически значимым листовым патогеном пшеницы, но только для регионов с теплым климатом, например для Бангладеш, Бразилии, Индии, Непала и др. (Manamgoda et al., 2011). Как правило, возбудители этой группы, если не находят подходящих условий, локализируются в местах завоза или обнаружения первичного очага. Также в случае если они обнаружены достаточно давно, то, ограниченные определенными климатическими зонами и кругом растений-хозяев, эти патогены не распространяются в новые районы. Будучи факультативными паразитами, они какое-то время могут находиться в растении, не вызывая болезни, впоследствии проявляя себя как гемибiotрофы. Началом проявления паразитических свойств данных патогенов может послужить также ослабление иммунитета растения, вызванное поражением другими возбудителями, например *Bipolaris maydis* или *Bipolaris turcica*. Поэтому часто на пораженных растениях вид *B. zeicola* встречается в комплексе с вышеуказанными видами. На это в своих работах указывали и американские ученые A.J. Ullstrup (1944) и A.L. Hooker (1974). Причем Hooker в 1973 г., несмотря на то что южная пятнистость листьев кукурузы была уже описана в 1938 г., назвал это заболевание новым, широко распространившимся в северной части кукурузного пояса США (Hooker, 1974). То есть все время до 1973 г. вид *B. zeicola* никак себя не проявлял в силу того, что комплекс необходимых условий для его развития был недостаточно полным.

Вредоносность возбудителей заключается в том, что при недостаточном комплексе условий они либо не проявляют своего присутствия, либо ведут себя как слабые патогены. Но при иных условиях, зачастую непредсказуемых, они проявляют свои разрушительные фитопатогенные свойства, вызывая эпифитотии и тяжелые поражения растений. Поэтому фитопатологи всего мира проявляют особый интерес к возбудителям этой группы, включая род *Cochliobolus*, представители которого введены в карантинные списки многих стран.

Симптомы проявления поражения видом *B. zeicola* отмечаются на всех надземных частях растения: листьях, стеблях, обертках початков и на самих початках с зерновками. Помимо этого, патоген постепенно проникает в ткани растения, тем самым вызывая корневую гниль и гниль початков, а также начальных всходов. На ранней стадии поражения растение имеет мелкие, бледно-зеленые или желтоватые пятна, которые в дальнейшем становятся коричневыми и приобретают овальную или округлую форму, иногда бывают неправильной формы, с более светлыми или пурпурными краями. На початках кукурузы поражаются зерновки, становясь со временем темными, покрываясь сажистым налетом и приобретая сморщенную, шероховатую поверхность.

This was also pointed out in their works by American scientists A.J. Ullstrup (1944) and A.L. Hooker (1974). Moreover, Hooker in 1973, despite the fact that southern leaf blight of maize had already been described in 1938, called this disease a new one, widely spread in the northern part of the US corn belt (Hooker, 1974). That is, all the time until 1973, the species *B. zeicola* did not manifest itself in any way due to the fact that the set of necessary conditions for its development was not complete enough.

The harmfulness of pathogens lies in the fact that under an insufficient set of conditions they either do not show their presence or behave like weak pathogens. But under other conditions, often unpredictable, they manifest their destructive phytopathogenic properties, causing epiphytotic and severe plant damage. Therefore, phytopathologists around the world are showing particular interest in pathogens of this group, including the genus *Cochliobolus*, whose representatives are included in the quarantine lists of many countries.

Symptoms of *B. zeicola* infection are noted on all above-ground parts of the plant: leaves, stems, cob wraps and on the cobs themselves with caryopses. In addition, the pathogen gradually penetrates the plant tissue, thereby causing root and cob rot, as well as initial shoots. In the early stage of infection, the plant has small, pale green or yellowish spots, which later turn brown and acquire an oval or round shape, sometimes they are irregular in shape, with lighter or purple edges. On the cob of corn, grains are affected, becoming dark over time, covered with a sooty coating and acquiring a wrinkled, rough surface.

The same symptoms of damage were noted in most species of the genus *Cochliobolus*, they are quite similar to each other, so the initial identification of *B. zeicola* species in the field and laboratory conditions can be quite difficult. Distinguishing closely related species based on symptoms alone is problematic (Manamgoda et al., 2014).

The identification of *Cochliobolus* genus species is usually based on morphological characters, but many species also share similar conidial characters that often make it difficult to identify a particular species. Accurate and rapid diagnosis of a pathogen requires the use of modern molecular genetic methods based on PCR. In 2017, Kang et al. from the National Institute of Crop Science developed species-specific primers (Bz-F/Bz-R) for classical PCR to diagnose the *B. zeicola* pathogen. As a result, the scientists validated the resulting test system for certain criteria – analytical sensitivity and specificity – and recommended it for use in identifying *B. zeicola* species in the laboratory.

For accurate identification, it is also possible to confirm the species by analyzing the nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) rDNA region, which allows to distinguish species of the genus *Cochliobolus*. Thus, compliance with the correctness of the stages of timely diagnosis of *Cochliobolus* species based on cultural and morphological characteristics and a combination of modern molecular methods is a priority in mycological research.

Такие же симптомы поражения отмечены у большинства видов рода *Cochliobolus*, они достаточно похожи между собой, поэтому первоначальное определение вида *B. zeicola* в полевых и лабораторных условиях бывает достаточно затруднительным. Различие близкородственных видов на основе одних только симптомов проблематично (Manamgoda et al., 2014).

Идентификация видов рода *Cochliobolus* обычно основана на морфологических характеристиках, однако многие виды также имеют сходные конидиальные признаки, по которым зачастую трудно идентифицировать конкретный вид. Для точной и быстрой диагностики патогена требуется применение современных молекулярно-генетических методов, основанных на проведении ПЦР. В 2017 г. Kang et al. из National Institute of Crop Science разработали видоспецифичные праймеры (Bz-F/Bz-R) для проведения классической ПЦР в целях диагностирования патогена *B. zeicola*. В результате ученые валидировали полученную тест-систему на определенные критерии – аналитические чувствительность и специфичность – и рекомендовали к применению для идентификации вида *B. zeicola* в лабораторных условиях.

Для точной идентификации возможно также подтверждение вида с помощью анализа нуклеотидных последовательностей участка внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рДНК, который позволяет различить виды рода *Cochliobolus*. Таким образом, соблюдение правильности этапов своевременной диагностики видов *Cochliobolus* на основе культурально-морфологических характеристик и сочетания современных молекулярных методов является приоритетным направлением в проведении микологических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлись изоляты карантинного вида *B. zeicola*, выделенные в результате исследования подкарантинной продукции семенного материала растений кукурузы импортного происхождения и полученные за период 2017–2021 гг. Для сравнительного анализа были использованы изоляты близкородственных видов *B. sorokiniana* Shoemaker, *B. maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoem., *B. zeae* Sivan. и виды родов *Fusarium* и *Alternaria*, присутствовавшие на растениях кукурузы.

В ходе работы использовали последовательную схему микологических исследований, состоящую из визуального, биологического, морфологического и молекулярно-генетического методов диагностики.

При поступлении образцов семян кукурузы от каждого образца отбирали пробы семян в количестве 400 шт. как с симптомами заболевания, прежде всего обращая внимание на щуплые, темные, сморщенные, с темным налетом зерновки, так и без симптомов заболевания. Далее для развития видимых структур гриба (спороношения) закладывали образцы во влажные камеры и на питательную среду. Для этого отобранные семена промывали под проточной водой и стерилизовали путем погружения в этиловый спирт на 1–2 мин, с последующим отмыванием в дистиллированной воде (в течение 3–5 мин). Подготовленный материал раскладывали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

The object of the study was isolates of the quarantine species *B. zeicola*, isolated as a result of the study of regulated seed material of corn plants of imported origin and obtained for the period 2017–2021. For comparative analysis, isolates of closely related species. *B. sorokiniana* Shoemaker, *B. maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoem., *B. zeae* Sivan. and species of the genera *Fusarium* and *Alternaria*, presented on corn plants, were used.

In the course of the work, a consistent scheme of mycological studies was used, consisting of visual, biological, morphological and molecular genetic diagnostic methods.

Once received corn seeds, 400 seed samples were taken from each sample, both with disease symptoms, primarily paying attention to feeble, dark, shriveled grains with a dark coating, and without symptoms. Then, for the development of visible structures of the fungus (sporulation), samples were placed in moist chambers on a nutrient medium. To do this, the selected seeds were washed under running water and sterilized by immersion in ethyl alcohol for 1–2 min, followed by washing in distilled water (for 3–5 min). The prepared material was placed in Petri dishes on moistened filter paper and in parallel on a nutrient medium (2% potato dextrose agar (PDA), pH 5.5). Corn samples were incubated at 25 °C followed by daily viewing for 10 days.

On the 3rd day, a velvety dense grayish-brownish-olive mycelium of the fungus appeared in Petri dishes. On the 7th day, under a binocular, it was possible to see formed conidiophores with conidia of the fungus on the developed mycelium. Subsequently, the mycelium of the fungus was sifted onto Petri dishes with PDA nutrient medium and isolated into a pure culture.

The species was identified by the morphological method with 25 spore measurements. When identifying, the size of conidia, their shape, color, number of septa and presence of hilum were taken into account.

To confirm the species belonging of the pathogen, classical PCR was used using specific primers Bz-F (5'-GAGAATACCGACCATGTGG-3') and Bz-R (5'-TATCTTTAGCTTCCTGTTTGGTC-3') with an amplification product size of 268 bp, developed by Korean scientists (Kang et al., 2018).

The applicability of the recommended primers according to Kang et al. was preliminarily assessed according to performance criteria. To determine the analytical sensitivity, a suspension from a pure culture of the *B. zeicola* standard sample with a DNA concentration of 24.2 ng/ml was used and a series of 10-fold dilutions was prepared in 3-fold replication. To determine the analytical specificity, isolates of the target *B. zeicola* cultures were used, as well as a number of fungal cultures obtained from corn plants as a result of studies in 2017–2021.

For this study, the mycelium was collected in 1.5 ml tubes with 200 µl extraction buffer, ground with a microtube pestle. DNA extraction was carried out using a ready-made commercial kit “Fito-Sorb” Syntol (Russia) according to the manufacturer's instructions.

PCR was performed in a T100 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad (USA). A mixture of reagents for setting

бумагу и параллельно на питательную среду (2%-й картофельно-глюкозный агар (КГА), pH 5,5). Инкубировали образцы кукурузы при 25 °C с последующим ежедневным просмотром в течение 10 дней.

На 3-и сутки в чашках Петри появился бархатистый плотный серовато-коричневато-оливковый мицелий гриба. На 7-е сутки под биноклем можно было разглядеть на развившемся мицелии сформировавшиеся конидиеносцы с конидиями гриба. В дальнейшем мицелий гриба отсеивали на чашки Петри с питательной средой КГА и выделяли в чистую культуру.

Определение вида проводилось морфологическим методом с 25 промерами спор. При идентификации учитывались размеры конидий, их форма, цвет, число перегородок, наличие хилума.

Для подтверждения видовой принадлежности патогена применяли классическую ПЦР с использованием специфичных праймеров Bz-F (5'-GAGAATACCGACCATGTGG-3') и Bz-R (5'-TATCTTTAGCTTCCTGTTGGTC-3') с размером продукта амплификации 268 п. о., разработанных корейскими учеными (Kang et al., 2018).

Предварительно проводили оценку применимости рекомендуемых праймеров по Kang et al. по рабочим критериям эффективности. Для определения аналитической чувствительности использовали суспензию из чистой культуры стандартного образца *B. zeicola* с концентрацией ДНК 24,2 нг/мл и готовили серию 10-кратных разведений в 3-кратной повторности. Для определения аналитической специфичности использовали изоляты целевых культур *B. zeicola*, а также ряд культур грибов, полученных с растений кукурузы в результате проведения исследований в 2017–2021 гг.

Для данного исследования мицелий отбирали в пробирки объемом 1,5 мл с экстрагирующим буфером 200 мкл, растирали пестиком для микропробирок. Выделение ДНК проводили с использованием готового коммерческого набора «Фито-Сорб» ООО «Синтол» (Россия) согласно инструкции производителя.

ПЦР проводили в термоблокере T100 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad (США). Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала 5 мкл ПЦР-буфера 5x Mas^{DD}TaqMix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия), 1,5 мМ каждого праймера, 2 нг целевой ДНК и стерильной воды.

Температурно-временные условия амплификации на приборе составляли: 1 цикл 3 мин – 94 °C; 35 циклов: 30 с – 94 °C, 30 с – 55 °C, 90 с – 72 °C; 1 цикл 7 мин – 72 °C.

После амплификации 4 мкл ПЦР-продукта раскапывали в лунки 1,0%-го агарозного геля с бромистым этидием в 0,5 × TBE-буфере и разделяли

up one reaction with a volume of 25 µl contained 5 µl of PCR buffer 5x MasDDTaqMix-2025 (Dialat Ltd., Russia), 1,5 µM of each primer, 2 ng of target DNA and sterile water.

The temperature-time conditions of amplification on the device were: 1 cycle 3 min – 94 °C; 35 cycles: 30 s – 94 °C, 30 s – 55 °C, 90 s – 72 °C; 1 cycle 7 min – 72 °C.

After amplification, 4 µl of the PCR product was dropped into the wells of a 1.0% agarose gel with ethidium bromide in 0.5 × TBE buffer, and the fragments were separated by length under the action of an external electric field. Subsequently, visualization was performed using a gel-documenting system.

In parallel, for the studied isolates, the nucleotide sequences of internal transcribed spacers were obtained (ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' / ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). The composition of the reagents for setting up one reaction was the same as for PCR according to Kang et al. The temperature-time conditions of amplification were: 1 cycle 3 min – 94 °C; 30 cycles: 30 s – 94 °C, 30 s – 52 °C, 90 s – 72 °C; 1 cycle 7 min – 72 °C. After amplification, the size of the PCR product was 550 bp.

The amplified samples were sequenced on a 3500 Applied Biosystems genetic analyzer (USA). Subsequently, the obtained nucleotide sequences of the ITS region of rDNA were processed using the BioEdit program and compared with the reference sequences of isolates from GenBank NCBI (ncbi.nlm.nih.gov). Phylogenetic analysis of isolates with the establishment



Рис. 1. Зерновки, пораженные возбудителем *Bipolaris zeicola*, и конидиеносцы гриба (а–б) (фото А.В. Камченкова)



Fig. 1. Corn seeds affected by the pathogen *Bipolaris zeicola*, and conidiophores of the fungus (a–b) (photos by A.V. Kamchenkov)

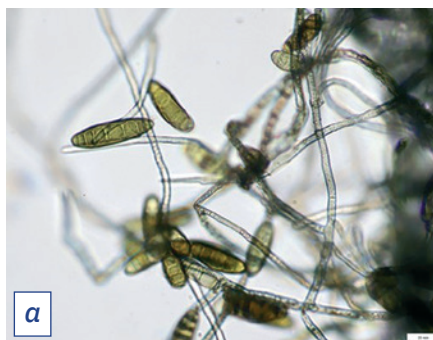


Рис. 2. Конидии *B. zeicola* (а–б) (увеличение × 40) (фото А.В. Камченкова)

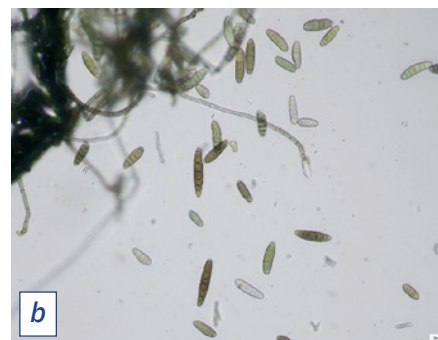


Fig. 2. Conidia *B. zeicola* (a–b) (x 40) (photos by A.V. Kamchenkov)

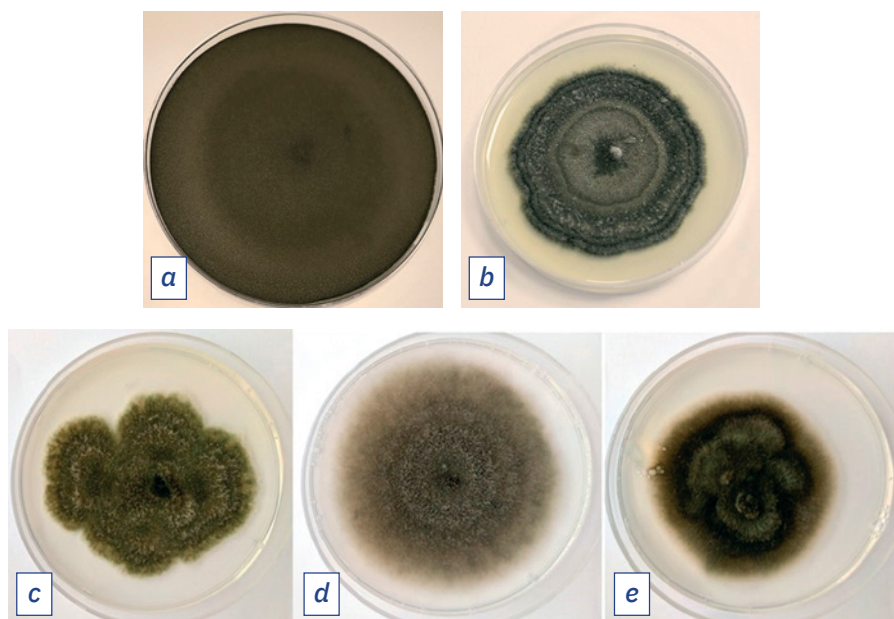


Рис. 3. Колонии *B. zeicola* на среде КГА (а–е)
(фото Ю.В. Цветковой, И.П. Дудченко)

Fig. 3. Colonies of *B. zeicola* on PDA medium (a–e)
(photos by Yu.V. Tsvetkova, I.P. Dudchenko)

фрагменты по длине под действием внешнего электрического поля. В дальнейшем проводили визуализацию с использованием гель-документирующей системы.

Параллельно для изучаемых изолятов были получены нуклеотидные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'/ITS4 5'-TCCTCCGCTTATGTGATGC-3') (White et al., 1990). Состав реактивов для постановки одной реакции был такой же, как для ПЦР по Kang et al. Температурно-временные условия амплификации составляли: 1 цикл 3 мин – 94 °С; 30 циклов: 30 с – 94 °С,

and rounded ends on both sides, olive-brown or dark brown in color, contained from 1 to 12 partitions, in size 45.7–64.3 × 10.7–12.6 μm, the average size was 53.7 ± 0.3 × 13.2 ± 0.5 μm. The hilum (the place of attachment of the conidia to the conidiophore) was absent in most conidia, in some it slightly protruded beyond the contour of the spore (Fig. 2).

When viewing dishes with a nutrient medium on the 7th day, the grown colony of *B. zeicola* was characterized by a velvety dense structure, brownish-olive color, with a grayish center. Later, on the 14th day, it acquired a darker brown color, with the formation of weak concentric spore-bearing circles (Fig. 3).

and comparison of homologous characters of isolates was carried out using the MEGA X software.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the primary visual inspection of regulated corn seed material, signs of damage to the grains by the pathogen *B. zeicola* were noted. Affected grains were characterized by non-marketable appearance, namely, they had a wrinkled, cracking surface with the presence of a dark sooty coating (Fig. 1). When viewed under binoculars, small groups or isolated dark brown conidiophores of the fungus are noted.

Microscopically, conidia of the species *B. zeicola* were characterized in shape from straight to fusiform, occasionally curved, with a slightly widened middle

Таблица 2

Морфологические характеристики конидий видов рода *Bipolaris*

Морфологические характеристики	<i>B. turcica</i>	<i>B. zeicola</i>	<i>B. maydis</i> , паса Т	<i>B. sorokiniana</i>
Размеры конидий (мкм)	45–145 × 11–33, чаще 90–100 × 20–24	21–94 × 9–19, чаще 50–60 × 13–14	25–126 × 20–23, чаще 80–90 × 13–14	20–135 × 12–34
Форма конидий	веретеновидные, прямые, иногда слегка согнутые, с утолщенной оболочкой	эллипсоидальные, веретеновидные, прямые, реже согнутые, с несколько расширенной серединой и незаостренными округлыми концами	эллипсоидальные, сильно согнутые, с тонкой оболочкой, расширенные к середине, постепенно суживающиеся к концам	удлиненно-яйцевидные, с закругленными концами
Окраска конидий	от прозрачно-дымчатых или светло-оливковых до желтовато-бурых и почти черных при созревании	оливково-бурые или темно-коричневые	от дымчатых и светло-оливковых до золотисто-коричневых	оливково-коричневые
Число перегородок	1–13, чаще 4–6	0–12, чаще 6–8	2–13, чаще 8	3–10
Хилум	темный, узкий, сильно выступает за контур споры	темный, малозаметный, слабо выступающий за контур споры	широкий, незаметный, не выступающий за контур споры	темный, слегка выступающий, усеченный

Table 2
Morphological characters of conidia of species of the genus *Bipolaris*

Morphological characters	<i>B. turcica</i>	<i>B. zeicola</i>	<i>B. maydis</i> , T race	<i>B. sorokiniana</i>
Conidia size (µm)	45–145 x 11–33, more often 90–100 x 20–24	21–94 x 9–19, more often 50–60 x 13–14	25–126 x 20–23, more often 80–90 x 13–14	20–135 x 12–34
Conidia shape	spindle-shaped, straight, sometimes slightly bent, with a thickened shell	ellipsoidal, fusiform, straight, rarely bent, with a slightly widened middle and non-pointed rounded ends	ellipsoidal, strongly bent, with a thin shell, widened towards the middle, gradually tapering towards the ends	elongated ovoid, with rounded ends
Conidia colour	from transparent smoky or light olive to yellowish brown and almost black when ripe	olive brown or dark brown	smoky and light olive to golden brown	olive brown
Number of septa	1–13, more often 4–6	0–12, more often 6–8	2–13, more often 8	3–10
Hilum	dark, narrow, protruding strongly beyond the contour of the spore	dark, inconspicuous, slightly protruding beyond the contour of the spore	wide, inconspicuous, not protruding beyond the contour of the spore	dark, slightly protruding, truncated

30 с – 52 °С, 90 с – 72 °С; 1 цикл 7 мин – 72 °С. После проведения амплификации размер ПЦР-продукта составлял 550 п. о.

Амплифицированные образцы секвенировали на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (США). В дальнейшем полученные нуклеотидные последовательности участка ITS рДНК обрабатывали с использованием программы BioEdit и сравнивали с эталонными последовательностями изолятов из GenBank NCBI (ncbi.nlm.nih.gov). Филогенетический анализ изолятов с установлением и сравнением гомологичных признаков изолятов проводили с использованием программы MEGA X.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате первичного визуального осмотра подкарантинной продукции семенного материала кукурузы были отмечены признаки поражения зерновок возбудителем *B. zeicola*. Пораженные зерновки характеризовались нетоварным внешним видом, а именно, имели сморщенную, растрескивающуюся поверхность с присутствием темного сажистого налета (рис. 1). При просмотре под биноклем отмечены небольшие группы или отдельно стоящие темно-коричневые конидиеносцы гриба.

При микроскопировании конидии вида *B. zeicola* характеризовались по форме от прямых до веретеновидных, изредка попадались изогнутые, с немного расширенной серединой и округлыми концами с двух сторон, оливково-коричневого или темно-коричневого цвета, содержали от 1 до 12 перегородок, размером 45,7–64,3 × 10,7–12,6 мкм,

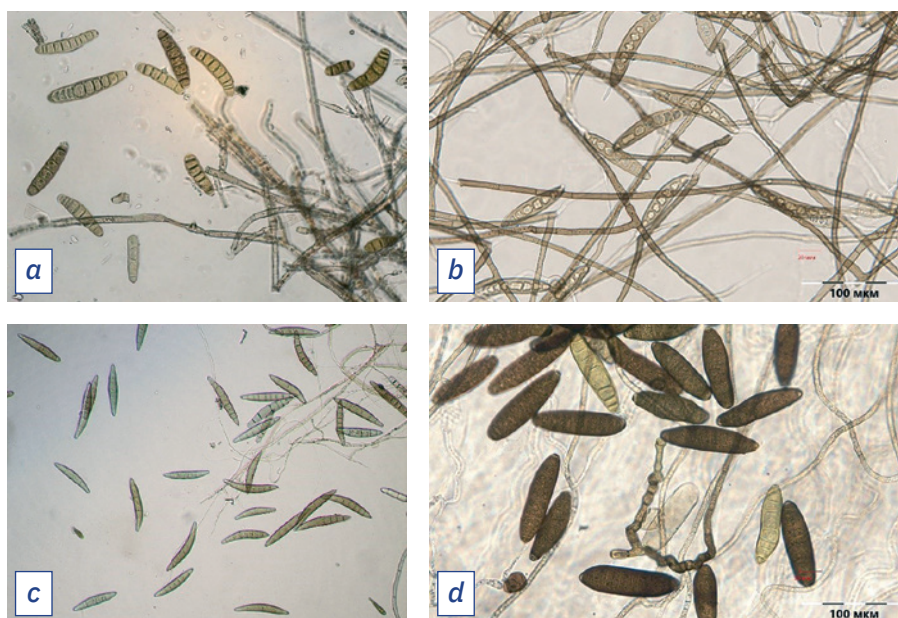


Рис. 4. Конидии видов рода *Bipolaris*:
а – *B. zeicola*; б – *B. maydis*;
с – *B. turcica*; д – *B. sorokiniana*
(увеличение x 20; x 40) (фото И.П. Дудченко)

Fig. 4. Conidia of *Bipolaris* species:
a – *B. zeicola*; b – *B. maydis*;
c – *B. turcica*; d – *B. sorokiniana* (x 20; x 40)
(photos by I.P. Dudchenko)

When diagnosing the quarantine pest *B. zeicola*, other species of the genus *Bipolaris* are often detected, which have similar cultural and morphological characters. For accurate identification, a number of characters are used, which together make it possible to identify the fungus species. Comparative characteristics are presented in table 2 and in figures 4–5.

As a result, a preliminary microscopic analysis showed that the morphological characters corresponded to *B. zeicola* species; molecular genetic methods were used to further study the pathogen.

In the process of work, species-specific primers Bz-F and Bz-R were tested to identify the species *B. zeicola*. As a result, analytical sensitivity and specificity

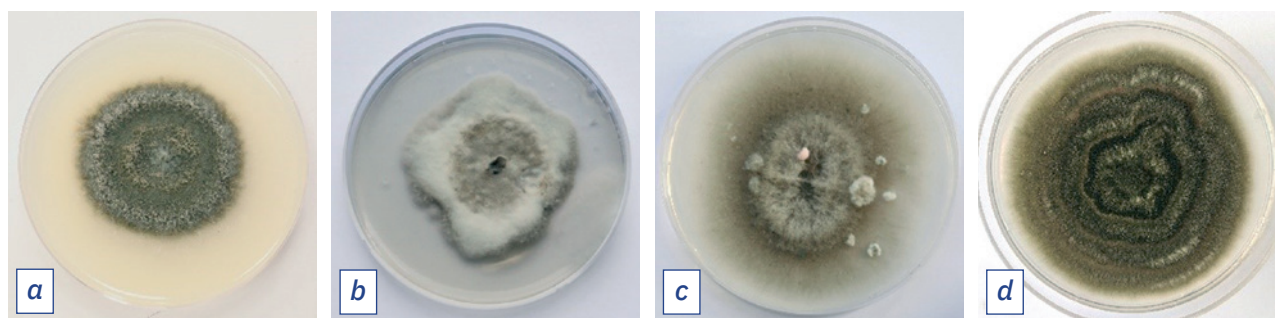


Рис. 5. Колонии видов рода *Bipolaris* на среде КГА: а – *B. turcica*; б, с – *B. maydis*; д – *B. sorokiniana* (фото И.П. Дудченко)

Fig. 5. Colonies of *Bipolaris* species on PDA medium: а – *B. turcica*; б, с – *B. maydis*; д – *B. sorokiniana* (photos by I.P. Dudchenko)

в среднем размер составлял $53,7 \pm 0,3 \times 13,2 \pm 0,5$ мкм. Хилум (место прикрепления конидий к конидиеносцу) у большинства конидий отсутствовал, у некоторых слабо выступал за контур споры (рис. 2).

При просмотре чашек с питательной средой на 7-е сутки подросшая колония *B. zeicola* характеризовалась бархатистой плотной структурой, коричневато-оливковой окраской, с сероватым центром. В дальнейшем, на 14-й день, она приобрела более темно-коричневую окраску, с образованием слабых концентрических спороносных кругов (рис. 3).

При диагностике карантинного организма *B. zeicola* часто встречаются другие виды рода *Bipolaris*, которые имеют сходные культурально-морфологические характеристики. Для точной идентификации используется ряд признаков, которые в совокупности позволяют определить видовую принадлежность гриба. Сравнительные характеристики представлены в таблице 2 и на рисунках 4, 5.

В результате предварительный микроскопический анализ показал, что морфологические признаки соответствовали виду *B. zeicola*, для дальнейшего изучения патогена применяли молекулярно-генетические методы.

В процессе работы апробированы видоспецифичные праймеры Bz-F и Bz-R для идентификации вида *B. zeicola*. В результате определены аналитические чувствительность и специфичность. По заключительным данным установлены рабочие критерии. В ходе исследования аналитическая чувствительность составила 0,0242 нг/мкл. Результаты представлены на рисунке 6 и в таблице 3.

Проведен анализ специфичности праймеров Bz-F и Bz-R с ДНК целевых изолятов *B. zeicola*, близкородственных *B. sorokiniana*, *B. zeae*, *B. maydis* и грибов, полученных в результате исследований подкарантинного материала кукурузы. Данные представлены в таблице 4. В результате проверки специфичности праймеров всех изолятов *B. zeicola* получены специфичные продукты размером 268 п. о. (рис. 7, 8). Близкородственные и сходные виды не давали продуктов амплификации ПЦР данного размера.

В результате исследований было установлено, что видоспецифичные праймеры Bz-F и Bz-R пригодны и применимы для проведения точной и быстрой идентификации *B. zeicola* в лабораторных условиях. Данная диагностическая система позволила выявить возбудителя в четырех разведениях

were determined. According to the final data, working criteria have been established. During the study, the analytical sensitivity was 0.0242 ng/μl. The results are presented in Figure 6 and Table 3.

There was performed specificity analysis of Bz-F and Bz-R primers with DNA of target isolates of *B. zeicola*, closely related to *B. sorokiniana*, *B. zeae*, *B. maydis* and fungi obtained as a result of studies of regulated corn. The data are presented in Table 4. As a result of testing the specificity of the primers of all *B. zeicola* isolates, specific products of 268 bp in size were obtained (Fig. 7, 8). Closely related and similar species did not produce PCR amplification products of this size.

As a result of the research, it was found that the species-specific primers Bz-F and Bz-R are suitable and applicable for accurate and rapid identification of *B. zeicola* in the laboratory. This diagnostic system made it possible to identify the pathogen in four DNA dilutions, the analytical sensitivity was 0.0242 ng/μl. The kit showed 100% analytical specificity for isolates of the target *B. zeicola* species.

In the course of a comparative analysis of the nucleotide sequences of the studied isolates of the genus *Bipolaris* in the region ITS4-5, 8S-ITS5 with database sequences, it was shown that the obtained sequences of the isolates clustered into homogeneous groups and belonged to four different species: *B. zeicola*, *B. maydis*, *B. sorokiniana* и *B. zeae* (Fig. 9).

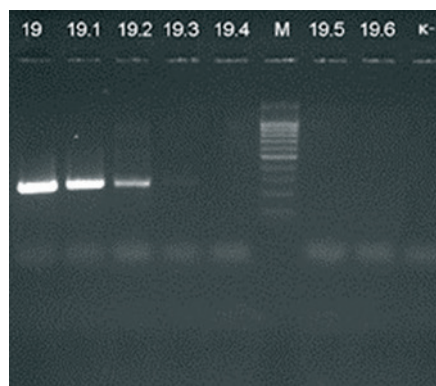


Рис. 6. Электрофореграмма с результатами аналитической чувствительности по Kang et al.

Fig. 6. Electropherogram with analytical sensitivity results according to Kang et al.

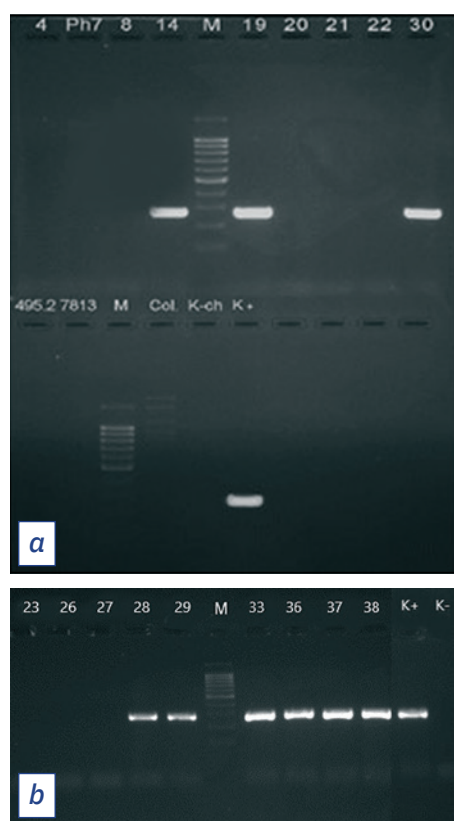


Рис. 7. Электрофореграммы с результатами аналитической специфичности выделенных изолятов по Kang et al. (a–b)

(14, 19, 28, 29, 30, 33, 36, 37, 38 – изоляты *B. zeicola*; 4, 20, 22 – изоляты *B. sorokiniana*; 8, 21 – изоляты *B. maydis*; 23, 26, 27 – *B. zeae*; Ph7 – *Phytophthora ramorum*; 495.2 – *Diaporthe vaccinii*; 7813 – *Monilinia fructicola*; Col – *Colletotrichum* sp.; K+ – положительный контроль; K–, K-ch – отрицательный контроль)

Fig. 7. Electrophoregrams with the results of the analytical specificity of isolated isolates according to Kang et al., 2018 (a–b)

(14, 19, 28, 29, 30, 33, 36, 37, 38 – isolates of *B. zeicola*; 4, 20, 22 – isolates of *B. sorokiniana*; 8, 21 – isolates of *B. maydis*; 23, 26, 27 – *B. zeae*; Ph7 – *Phytophthora ramorum*; 495.2 – *Diaporthe vaccinii*; 7813 – *Monilinia fructicola*; Col – *Colletotrichum* sp.; K+ – positive control; K–, K-ch – negative control)

ДНК, аналитическая чувствительность составила 0,0242 нг/мкл. Набор показал 100%-ю аналитическую специфичность по отношению к изолятам целевого вида *B. zeicola*.

В ходе проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей изучаемых изолятов рода *Bipolaris* по участку ITS4-5, 8S-ITS5 с сиквенсами баз данных показано, что полученные последовательности изолятов кластеризовались в однородные группы и относились к четырем различным видам: *B. zeicola*, *B. maydis*, *B. sorokiniana* и *B. zeae* (рис. 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований из растительного и семенного материала кукурузы выделено 24 изолята, принадлежащих к роду *Bipolaris*: 13 изолятов вида *B. zeicola*, 5 изолятов вида *B. sorokiniana*, 3 изолята вида *B. zeae* и 3 изолята вида *B. maydis*. По данным исследования, вид *B. zeicola* был выявлен в 13 из 422 образцов семян кукурузы различного происхождения. Случаи выявления карантинного вида *B. zeicola* подтверждают высокий фитосанитарный риск проникновения

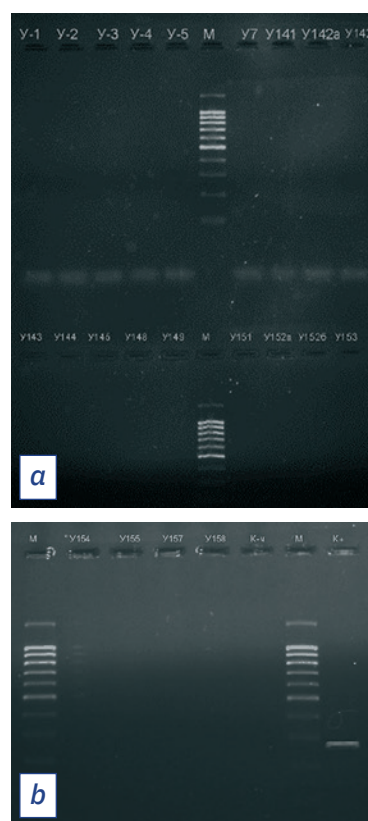


Рис. 8. Электрофореграммы с результатами аналитической специфичности выделенных нецелевых видов по Kang et al. (a–b)

(Y1, Y141, Y142a, Y142b, Y143, Y148–Y151, Y152a, Y152b, Y153–Y155, Y157, Y158 – виды рода *Fusarium* sp.; Y7 – *F. sporotrichioides*; Y2 – *Alternaria alternata*; Y3–Y5 – *Alternaria* sp.; K+ – положительный контроль; K– – отрицательный контроль)

Fig. 8. Electrophoregrams with the results of the analytical specificity of isolated non-target species according to Kang et al., 2018 (a–b)

(Y1, Y141, Y142a, Y142b, Y143, Y148–Y151, Y152a, Y152b, Y153–Y155, Y157, Y158 – *Fusarium* sp.; Y7 – *F. sporotrichioides*; Y2 – *Alternaria alternata*; Y3–Y5 – *Alternaria* sp.; K+ – positive control; K– – negative control)

CONCLUSION

As a result of the studies, 24 isolates belonging to the genus *Bipolaris* were isolated from corn plant and seed material: 13 isolates of *B. zeicola* species, 5 isolates of *B. sorokiniana* species, 3 isolates of *B. zeae* species, and 3 isolates of *B. maydis* species. According to the study, *B. zeicola* was identified in 13 out of 422 corn seed samples of various origins. Cases of detection of the quarantine species *B. zeicola* confirm the high phytosanitary risk of introduction of invasive species into the territory of the Russian Federation, therefore it is very important to timely check regulated products for the absence of quarantine fungi using modern diagnostic methods.

As a result of testing the species-specific primers Bz-F and Bz-R used for classical PCR, the studies showed the effectiveness of this test system and its applicability in the laboratory for accurate and rapid identification of the quarantine pathogen *C. carbonum* R.R. Nelson (= *B. zeicola* (Stout) Shoemaker).

Таблица 3
Результаты аналитической
чувствительности праймеров Bz-F и Bz-R
Table 3
Analytical sensitivity results
for the primers Bz-F и Bz-R

Разведения Dilutions	Номер дорожки на электрофореграмме Track number on the electropherogram	Повторности Repetitions	Количество ДНК, нг/мкл Amount of DNA, ng/ μ l	Наличие (+) или отсутствие (-) продукта амплификации размером 268 п. о. The presence (+) or absence (-) of the 268 bp amplification product
0	19	1	24,2	+
		2		+
		3		+
1	19.1	1	2,42	+
		2		+
		3		+
2	19.2	1	0,242	+
		2		+
		3		+
3	19.3	1	0,0242	+
		2		+
		3		+
4	19.4	1	0,00242	-
		2		-
		3		-
5	19.5	1	0,000242	-
		2		-
		3		-
6	19.6	1	0,0000242	-
		2		-
		3		-
7	K-	1	0	-
		2		-
		3		-

инвазивных видов на территорию РФ, поэтому очень важно своевременно проверять подкарантинную продукцию на отсутствие карантинных грибов с помощью современных методов диагностики.

В результате проведения апробации видоспецифичных праймеров Bz-F и Bz-R, используемых для классической ПЦР, исследования показали эффективность данной тест-системы и применимость ее в лабораторных условиях для точной и быстрой идентификации карантинного возбудителя южной пятнистости кукурузы *C. carbonum* R.R. Nelson (= *B. zeicola* (Stout) Shoemaker).

Проведение предварительных культурально-морфологических и последующих молекулярно-генетических анализов подтвердило идентификацию карантинного вида *B. zeicola* в импортном

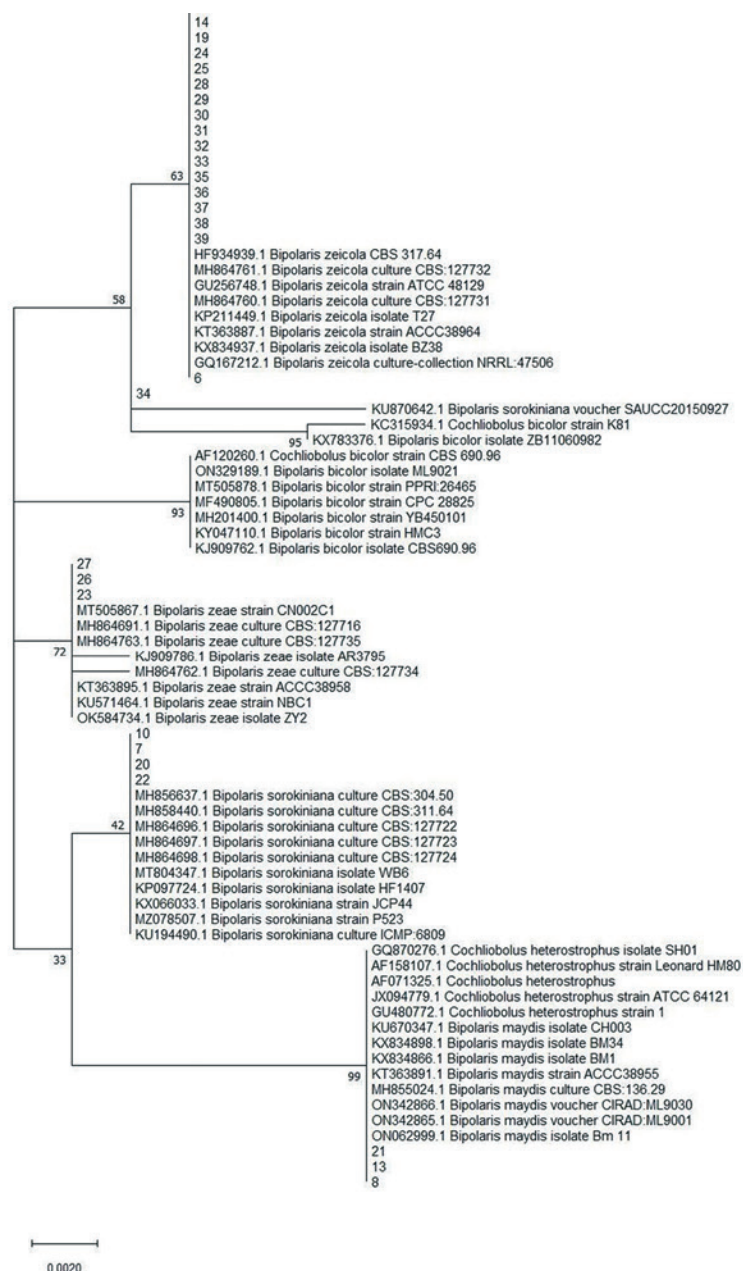


Рис. 9. Дендрограмма,
построенная на основании
последовательностей участков
внутреннего транскрибируемого
спейсера. Метод максимального
правдоподобия, модель JC

Fig. 9. Dendrogram
built on the basis of the
sequences of sections of
the internal transcribed
spacer. Maximum likelihood
method, JC model

Conducting preliminary cultural and morphological and subsequent molecular genetic analyzes confirmed the identification of the quarantine species *B. zeicola* in imported seed material. Thus, the combination of classical and modern molecular methods for diagnosing dangerous quarantine species in incoming regulated products guarantees the reliability of the results of mycological studies.

REFERENCES

1. Alexandrov I. The problem of leaf blight of maize and ways to solve it [Problema yuzhnogo

Таблица 4

Изоляты грибов рода *Cochliobolus*, выделенные в ходе работы

Table 4

Isolates of *Cochliobolus* sp. fungi isolated in the course of work

№ п/п	Номер изолята Isolate number	Вид Species	Растение-хозяин Host plant	Host plant seeds	Страна происхождения Origin	Origin
1	1	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	США	USA
2	2	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	США	USA
3	14	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	Франция	France
4	19	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	США	USA
5	28	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
6	29	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
7	30	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	Франция	France
8	33	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
9	34	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
10	36	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
11	37	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
12	38	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
13	39	<i>B. zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	семена кукурузы	corn seeds	–	–
14	4	<i>B. sorokiniana</i> Shoemaker	семена ячменя	barley seeds	–	–
15	20	<i>B. sorokiniana</i> Shoemaker	семена пшеницы	wheat seeds	–	–
16	22	<i>B. sorokiniana</i> Shoemaker	семена пшеницы	wheat seeds	–	–
17	10	<i>B. sorokiniana</i> Shoemaker	семена пшеницы	wheat seeds	–	–
18	7	<i>B. sorokiniana</i> Shoemaker	семена ячменя	barley seeds	–	–
19	23	<i>B. zea</i> Sivan.	–	–	–	–
20	26	<i>B. zea</i> Sivan.	–	–	–	–
21	27	<i>B. zea</i> Sivan.	–	–	–	–
22	8	<i>B. maydis</i> (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoem.	семена кукурузы	corn seeds	Россия	Russia
23	13	<i>B. maydis</i> (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoem.	семена кукурузы	corn seeds	КНР	China
24	21	<i>B. maydis</i> (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoem.	семена кукурузы	corn seeds	Россия	Russia

семенном материале. Таким образом, сочетание классических и современных молекулярных методов диагностики опасных карантинных видов в поступающей подкарантинной продукции гарантирует надежность результатов микологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров И., 1992. Проблема южного гельминтоспориоза кукурузы и способы ее решения. – Проблемы карантина растений, № 2: 103–107.
2. Боровская М., Матичук В., 1990. Новый вид гельминтоспориозной пятнистости на кукурузе в Молдавии. – Изв. АН Молдавской ССР: 25–38.
3. Мартынюк Т., 2003. Возбудители грибных болезней листьев кукурузы (*Zea mays*) в Приморском крае. – Микология и фитопатология, 37 (3): 80–85.
4. Cipollone J. et al., 2020. First report of *Bipolaris zeicola* on barley worldwide. – Crop Protection, Vol. 135: 105188. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105188>.
5. Hooker A., 1974. Field reaction of corn inbreds to Helminthosporium leaf spot. – Plant Dis. Repr., 58: 909–911.
6. Kang I. et al., 2018. Simple Detection of *Cochliobolus* Fungal Pathogens in Maize. – Plant Pathol J.,

gel'mintosporioza kukuruzy i sposoby yeye resheniya]. *Plant Quarantine Issues*, 1992; 2: 103–107 (in Russian).

2. Borovskaya M., Matichuk V. A new type of leaf blight of maize in Moldova [Novyy vid gel'mintosporioznoy pyatnistosti na kukuruze v Moldavii]. *Izv. Academy of Sciences of the Moldavian SSR*: 1990; 25–38 (in Russian).

3. Martynyuk T. Causative agents of fungal diseases of corn leaves (*Zea mays*) in Primorsky Krai [Vozbuditeli gribnykh bolezney list'yev kukuruzy (*Zea mays*) v Primorskom kraye]. *Mycology and Phytopathology*, 2003; 37 (3): 80–85 (in Russian).

4. Cipollone J. et al. First report of *Bipolaris zeicola* on barley worldwide. *Crop Protection*, 2020; Vol. 135: 105188. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105188>.

5. Hooker A. Field reaction of corn inbreds to Helminthosporium leaf spot. *Plant Dis. Repr.*, 1974; 58: 909–911.

6. Kang I. et al. Simple Detection of *Cochliobolus* Fungal Pathogens in Maize. *Plant Pathol J.*, 2018;

34 (4): 327–334. URL: <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.10.2017.0209>.

7. Manamgoda D. et al., 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. – *Fungal Diversity*, Vol. 51: 3–42. URL: <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0139-4>.

8. Manamgoda D. et al., 2014. The genus *Bipolaris*. – *Studies in mycology*, Vol. 79: 221–288. URL: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.

9. Rabie A. El-Shafey et al., 2018. Incidence and Molecular Identification of *Cochliobolus carbonum* as Causal Organism of Rice Seedling Blight. – *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7 (4): 652–662.

10. Ullstrup A., 1944. Further studies on a species of *Helminthosporium* parasitizing corn. – *Phytopathology*, Vol. 34: 214–222.

11. White T. et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. – New York: Academic Press, 315–322 p.

12. Справочник по карантинному фитосанитарному состоянию территорий государств – участников СНГ на 01.01.2018. – URL: <https://vniikr.ru/files/spravochnik/%D0%BD%D0%B0%2001.01.2019.pdf> (дата обращения: 02.08.2022).

13. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int/taxon/COCHCA/distribution> (дата обращения: 02.08.2022).

14. Index Fungorum. – URL: <http://www.species-fungorum.org> (дата обращения: 02.08.2022).

15. National Center for Biotechnology Information. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения: 02.08.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Камченков Александр Владимирович, заведующий лабораторией микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: akamchenkov@mail.ru.

Цветкова Юлия Владиславовна, младший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; аспирант биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия; ORCID 0000-0002-4334-9224, e-mail: yutska@mail.ru.

Кузнецова Анна Александровна, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru.

Дудченко Ирина Петровна, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-0169-414X, e-mail: irinafito129@mail.ru.

Усманова Гульназ Радиковна, студент ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия; e-mail: gulnaz.usmanova005@mail.ru.

34 (4): 327–334. URL: <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.10.2017.0209>.

7. Manamgoda D. et al. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, 2011; Vol. 51: 3–42. URL: <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0139-4>.

8. Manamgoda D. et al. The genus *Bipolaris*. *Studies in mycology*, 2014; Vol. 79: 221–288. URL: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.

9. Rabie A. El-Shafey et al. Incidence and Molecular Identification of *Cochliobolus carbonum* as Causal Organism of Rice Seedling Blight. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2018; 7 (4): 652–662.

10. Ullstrup A. Further studies on a species of *Helminthosporium* parasitizing corn. *Phytopathology*, 1944; Vol. 34: 214–222.

11. White T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1990, 315–322 p.

12. Reference book on the quarantine phytosanitary status of the territories of the CIS member states as of 01.01.2018. URL: <https://vniikr.ru/files/spravochnik/%D0%BD%D0%B0%2001.01.2019.pdf> (last accessed: 02.08.2022).

13. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/COCHCA/distribution> (last accessed: 02.08.2022).

14. Index Fungorum. URL: <http://www.species-fungorum.org> (last accessed: 02.08.2022).

15. National Center for Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (last accessed: 02.08.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandr Kamchenkov, Head of Mycology Laboratory, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: akamchenkov@mail.ru.

Yulia Tsvetkova, Junior Researcher, Mycology Laboratory, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; PhD student, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ORCID 0000-0002-4334-9224, e-mail: yutska@mail.ru.

Anna Kuznetsova, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Mycology and Helminthology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru.

Irina Duchenko, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Mycology and Helminthology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-0169-414X, e-mail: irinafito129@mail.ru.

Gulnaz Usmanova, student of Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia; e-mail: gulnaz.usmanova005@mail.ru.