

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

на правах рукописи

Абрамова Светлана Леонидовна

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ –
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭКОНОМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ПЦР**

Специальность 03.02.12 - микология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии Россельхозакадемии

Научный руководитель: член-корреспондент Россельхозакадемии,
доктор биологических наук, профессор
Завриев Сергей Кириакович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Еланский Сергей Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Бабаков Алексей Владимирович

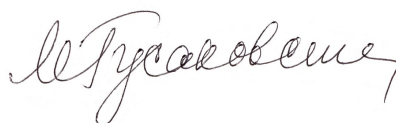
Ведущая организация: Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт защиты растений
Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится 15 ноября 2013 года в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. 389. Т/факс: (495) 939-39-70.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан « » октября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М. А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые грибами, наносят существенный ущерб урожаю и приводят к экономическим потерям (Eyal, 1999; Санин и др., 2010). Применение интенсивных технологий при возделывании зерновых культур зачастую приводит к ухудшению фитосанитарной ситуации не только с наиболее распространенными и вредоносными грибами, такими как *Septoria tritici* и *Stagonospora nodorum* и возбудителями корневых гнилей и фузариоза колоса из рода *Fusarium* (Иващенко и др., 2004; Санин и др., 2010), но также способствует расширению ареала и увеличению вредоносности возбудителей ржавчины *Puccinia striiformis* и *P. graminis* (Назарова и др., 2008).

Для своевременного применения средств защиты растений от болезней и контроля зараженности зерна фитопатогенными грибами на разных стадиях его производства и переработки необходима их детекция и точная идентификация (Kristensen et al., 2005; Lievens et al., 2005). В полевых условиях предварительный диагноз болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, ставят по проявлению симптомов заболевания, а точную идентификацию возбудителя проводят в лаборатории главным образом по морфологии спор и другим морфолого-культуральным признакам патогена с применением методов микроскопии и культивирования на питательных средах. Однако, морфологические характеристики спор у близкородственных видов микромицетов могут совпадать, а внутри одного вида значительно варьировать. Кроме того, симптомы болезни могут проявляться нетипично или заболевание может проходить в скрытой форме (Пыжикова, 1984; Иващенко и др., 2004; Shcherbakova, 2007). В связи с этим применение более чувствительных методов является актуальным и востребованным в диагностике фитопатогенов.

В последние годы для идентификации и детекции фитопатогенных микроорганизмов все чаще применяется метод ПЦР. Он превосходит традиционные методы по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа, производительности, и служит их существенным дополнением. Кроме того, его применение не требует глубоких знаний биологии и морфологии исследуемых микромицетов (McCartney et al., 2003; Lievens et al., 2005).

Усовершенствование методов секвенирования и создание электронных баз данных, хранящих информацию о структуре геномов различных фитопатогенов (Geiser et al., 2004; Geer et al., 2010), дает возможность при разработке видоспецифичных праймеров наиболее полно учитывать и

использовать вариабельность анализируемых последовательностей нуклеотидов. Это обеспечивает высокую специфичность диагностическим системам, создаваемым на их основе.

Среди методов, основанных на полимеразной цепной реакции, одним из наиболее адаптированных для практического применения является метод ПЦР с детекцией результатов в формате FLASH (качественная флуоресцентно-гибридизационная полимеразная цепная реакция). Использование флуорогенных зондов повышает чувствительность метода. Детекцию флуоресценции проводят сразу после окончания амплификации, что существенно ускоряет процесс получения результатов, по сравнению с электрофорезом в геле. Кроме того, при соблюдении правил работы исключается возможность контаминации рабочей зоны продуктами амплификации, а программное обеспечение облегчает сбор и хранение информации о проводимых тестах. Наличие внутреннего контроля (ВК) прохождения реакции повышает надежность метода и позволяет контролировать появление ложноотрицательных результатов.

Метод FLASH-ПЦР ранее был применен для создания систем диагностики фитопатогенных вирусов, бактерий, нематод и грибов, в том числе и карантинных (Кулинич и др., 2008; Рязанцев, 2009; Рязанцев и Завриев, 2009).

Цель и задачи исследований. Целью настоящей диссертационной работы являлась разработка праймеров и зондов для идентификации грибов - возбудителей септориоза (*Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum*), фузариозов (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. langsethiae*), желтой (*Puccinia striiformis*) и стеблевой (*P. graminis*) ржавчины зерновых культур.

Основные задачи:

1. Выявить в геноме исследуемых грибов локусы, наиболее перспективные для их идентификации.
2. Разработать праймеры для идентификации и диагностики исследуемых видов.
3. Оптимизировать условия ПЦР с разработанными праймерами и проверить их специфичность на изолятах исследуемых видов грибов, собранных на территории РФ.
4. Разработать зонды и оптимизировать условия ПЦР для диагностики возбудителей септориоза и фузариоза в формате FLASH.

Научная новизна исследований. Разработаны высокоспецифичные праймеры для основанной на ПЦР идентификации и диагностики одиннадцати

видов экономически значимых грибных патогенов зерновых культур. Для девяти из них сконструированы зонды и создана система детекции с помощью ПЦР в формате FLASH, что позволило сократить время анализов и обеспечить надежную и точную идентификацию фитопатогенов.

Практическая значимость исследований. Разработанные праймеры и зонды стали основой для создания и внедрения в производство на базе ЗАО «НПФ ДНК-Технология» коммерческих наборов для идентификации и детекции возбудителей септориоза и фузариозов методом ПЦР в формате FLASH, а, впоследствии, и для наборов в формате ПЦР в реальном времени. Праймеры для идентификации возбудителей ржавчины подобраны с учетом требований к системам детекции в формате FLASH и могут быть использованы для разработки таких систем.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» (Россия, 2008) и на семинаре «Школа молодых ученых и аспирантов по молекулярной биологии - NOVA» (Финляндия, 2008).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Объем работы составляет 105 страниц. В диссертации содержится 9 таблиц и 31 рисунок. Список литературы содержит 154 источника, из них 132 иностранных авторов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе рассмотрено современное состояние в области биологии и эпидемиологии возбудителей ряда грибных патогенов зерновых культур. Подробно описаны имеющиеся в литературе данные о распространенности и вредоносности исследуемых видов грибов. Обсуждены различные методы диагностики грибных патогенов и требования, которым должны соответствовать диагностические системы, разработанные на основе метода ПЦР. Особое внимание уделено анализу существующих систем ПЦР-детекции и идентификации грибных фитопатогенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. В работе использованы изоляты грибов *S. tritici* и *S. nodorum*, предоставленные к.б.н. старшим научным сотрудником Отдела

микологии и иммунитета ВНИИ фитопатологии Россельхозакадемии (ВНИИФ) Е. В. Пахолковой. Листья пшеницы с симптомами септориоза и пикнидами грибов *S. tritici* и *S. nodorum* были предоставлены д.б.н., заведующим Лабораторией микологии и фитопатологии им. А. А. Ячевского ВНИИ защиты растений Россельхозакадемии (ВИЗР) А. П. Дмитриевым.

Часть изолятов грибов рода *Fusarium* были предоставлена к.б.н., ведущим научным сотрудником Лаборатории микологии и фитопатологии им. А. А. Ячевского ВИЗР Т. Ю. Гагкаевой, а другая часть - к.б.н. старшим научным сотрудником Отдела микологии и иммунитета ВНИИФ Н. С. Жемчужиной.

Изоляты грибов рода *Puccinia*, выделенные из растений пшеницы, были взяты из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из грибов рода *Septoria*, *Stagonospora* и *Fusarium* небольшое количество мицелия (приблизительно 25 мг) 5-7-дневной культуры помещали в 1,5 мл пробирки с 50 мкл стерильной дистиллированной воды. Гомогенизировали мицелий в пробирке пестиком. Выделение ДНК проводили с помощью набора «Проба-ГС», следуя протоколу фирмы производителя (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия).

Для выделения ДНК из грибов рода *Puccinia* споры каждого изолята в количестве приблизительно 25 мг измельчали на гомогенизаторе TissueLyser LT («QIAGEN», Германия) в течение 15 минут с помощью шариков Tungsten Carbide Beads (3 мм) в режиме встряхивания пробирок с частотой 30 Гц. После этого из полученной мицелиальной массы выделяли ДНК с использованием набора «Проба-ГС», следуя протоколу фирмы производителя.

Подбор праймеров и зондов. Выравнивание последовательностей нуклеотидов, депонированных в ГенБанке, проводили с применением программы AlignX пакета Vector NTI Suite 8,0 (алгоритм ClustalW). Анализ нуклеотидных последовательностей для подбора олигонуклеотидов осуществляли с помощью программы Oligo 6,71.

Праймеры подбирали длиной 18-25 п.н. с температурой плавления 68-71°C таким образом, чтобы фланкируемая ими нуклеотидная последовательность составляла около 350-400 п.н. При использовании в ПЦР реакции внутреннего контроля (ВК), длина ампликона которого составляла 560 п.н., разница в длинах ампликонов специфического продукта и ВК обеспечивала их четкое разделение при проведении электрофоретического анализа.

Видоспецифичность сконструированных праймеров предварительно

проверяли с помощью программы BLAST, имеющейся на сайте National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Для создания зонда типа «молекулярный маячок» выбирали последовательность нуклеотидов внутри специфического ампликона, общую для нескольких исследуемых видов в пределах рода, длиной около 25 п.н. и с температурой плавления в пределах 79-81°C, которая рассчитывалась с помощью программы Oligo 6,71. Эта последовательность нуклеотидов входила в состав петли зонда, а в некоторых случаях частично и в состав стебля. Чтобы зонд принял форму шпильки к центральной его части, комплементарной участку амплифицируемой ДНК, с 5'- и 3'-концов, с учетом данных программы mfold 3,2 (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>), добавляли нуклеотиды С и G, комплементарное спаривание которых образовывало стебель структуры зонда.

Проведение ПЦР. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» ТП4-ПЦР-01 (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). Для видов рода *Septoria*, *Stagonospora* и *Fusarium* реакционная смесь объемом 35 мкл содержала 3,5 мкл 10x буфера (750 mM Трис-НСl, рН 8,8, 200 mM сульфат аммония, 0,1% Твин-20), 1 mM каждого dNTP, по 12,5 пмоль праймеров, 2,5 ед. *Taq*-полимеразы и 5 мкл раствора ДНК (как правило, около 3-5 нг ДНК на реакцию). При проведении ПЦР с ВК в указанную реакционную смесь добавляли 0,002 пг плазмиды ВК и по 12,5 пмоль праймеров для ВК. Преимущественная амплификация специфического продукта происходила за счет оптимизации концентрации матрицы ВК в реакционной смеси. Для проведения ПЦР в формате FLASH, в реакционную смесь добавляли зонд для ВК (3,5 пмоль) и специфичный зонд (3,5 или 7 пмоль). Для определения фоновой флуоресценции использовалась та же реакционная смесь, только без добавления *Taq*-полимеразы.

Для снижения уровня неспецифического отжига праймеров до начала реакции амплификации компоненты смеси пространственно разделяли слоем парафина, при этом нижняя часть смеси содержала праймеры, зонд, буфер и dNTPs, а верхняя - *Taq*-полимеразу и ДНК.

Для работы с ДНК грибов рода *Puccinia* реакционная смесь так же была объемом 35 мкл и содержала 3,5 мкл 10x буфера, 1 mM каждого dNTP, по 12,5 пмоль праймеров, 2,5 ед. *Taq*-полимеразы и 5 мкл раствора ДНК (около 3-5 нг ДНК на реакцию).

Специфичность праймеров для видов *S. tritici*, *S. nodorum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. langsethiae* проверяли по оптимизированной программе: (93°C - 90 сек) - 1

цикл; (93°C - 20 сек, 64°C, 67°C или 70°C - 10 сек) – 5 циклов; (93°C - 1 сек, 64°C, 67°C или 70°C - 10 сек) – 40 циклов. Оптимальными считались праймеры, с которыми при температуре отжига 64°C происходила специфичная амплификация ПЦР-продукта, и которые не теряли своей эффективности при температуре отжига 67°C. Эффективность ПЦР оценивали по интенсивности свечения полос в геле после электрофореза продуктов амплификации. FLASH-ПЦР для перечисленных выше видов проводили по программе: (93°C - 90 сек) - 1 цикл; (93°C - 20 сек, 64°C - 5 сек, 67°C - 5 сек) – 5 циклов; (93°C - 1 сек, 64°C - 5 сек, 67°C - 5 сек) – 40 циклов.

Температуру отжига праймеров для амплификации специфических фрагментов ДНК видов *P. graminis*, *P. striiformis* подбирали в рамках программы: (93°C - 130 сек) - 1 цикл, (93°C - 15 сек, 60°C-67 °C - 10 сек, 72°C - 15 сек) - 40 циклов, (72°C - 190 сек) - 1 цикл.

Анализ продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (40 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 20 мМ ледяной уксусной кислоты и 1 мМ EDTA) при постоянном напряжении 10 В/см. Гели окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл, Маниатис и др., 1984) и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Для определения молекулярного веса амплифицированных фрагментов использовали ДНК маркер 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н. GeneRuler («Fermentas», Литва).

Анализ продуктов ПЦР в формате FLASH. Регистрацию уровня флуоресценции в реакционной смеси проводили после окончания ПЦР с помощью детектора «Джин» (НПФ «ЗАО ДНК-технология», Россия). При амплификации специфических ПЦР-продуктов флуоресцентное излучение детектировалось от красителя FAM (длины волны возбуждения/излучения 470/514 нм), а о результатах амплификации с ВК судили по флуоресценции красителя HEX (длина волн возбуждения/излучения 532/580 нм). Уровень флуоресценции в фоновых пробирках принимался за единицу, а величина специфического сигнала и сигнала ВК рассчитывалась программой в единицах фона: сигнал «ВК» больше 2,5 принимался за положительный (+); сигнал «Специфики» больше 2,1 регистрировался как положительный (+), менее 1,75 - отрицательный (-), а между 1,75 и 2,5 - сомнительный (?); при значениях сигнала «ВК» и «Специфики» меньше 1,75 результат считался недостоверным. Обсчет данных происходил автоматически по прилагаемой к флуориметру программе, после чего результаты анализа выводились в виде гистограмм и таблицы на монитор компьютера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Подбор праймеров для идентификации видов *S. tritici* и *S. nodorum* и проверка их видоспецифичности

В качестве мишеней для разработки видоспецифичных праймеров к *S. tritici* и *S. nodorum* были выбраны гены рРНК и β -тубулина (*β -tub*). При выравнивании депонированных в ГенБанке последовательностей нуклеотидов этих генов по алгоритму ClustalW и анализа их в программе Oligo 6,71 были выявлены полиморфные и/или консервативные локусы, которые по своим параметрам подходили для подбора праймеров и зондов. Для гена *β -tub*, гомология последовательностей которого для двух видов составляла 65 %, были подобраны две пары праймеров на каждый вид (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры, подобранные для идентификации видов *S. tritici* и *S. nodorum* методом ПЦР

Вид	Область генома	Название	Последовательность (5'→3')	Tm	Ампликон, п.н.
<i>S. tritici</i>	<i>β-tub</i>	StTubr	TTGAAGATGTCGTCCACCTTCGT ¹	70.6	220
<i>S. nodorum</i>		SnTubr	TCTCAAGATGTCCGCCACCTTC ¹	71.0	220
<i>S. tritici</i> , <i>S. nodorum</i>		STubf	TTCGACCCCAAGAAATGATGG ¹	71.5	-
<i>S. tritici</i>		STubFs	AACATGATGGCCGCCAGC ²	69.3	210
<i>S. tritici</i>		STubRs	GAAGGTGGACGACATCTTCAAT ²	65.4	
<i>S. nodorum</i>		SNtubFs	CAAGAACATGATGGCTGCCTCT ²	68.9	210
<i>S. nodorum</i>		SNtubRs	AGGTGGCGGACATCTTGAGA ²	67.2	
<i>S. tritici</i>		рРНК	StITSF1	TCCGACCTCCAACCCTTTGTG ¹	71.6
<i>S. nodorum</i>	SnITSF1		TATCCACCCTTGTCTTTTGCGG ¹	71.2	230
<i>S. tritici</i>	StITSf2		ACCTCCAACCCTTTGTGAACACA ²	70.4	230
<i>S. nodorum</i>	SnITSf2		GTATAGCGCAAGCTGATGAGCAG ²	69.5	260
<i>S. tritici</i> , <i>S. nodorum</i>	SITSR		GCAATGTGCGTTCAAAGATTCG ^{1,2}	70.4	-
<i>S. tritici</i>	STitsFs		CTCCAACCCTTTGTGAACACA ³	65.3	230
<i>S. nodorum</i>	SNitsFs		TATAGCGCAAGCTGATGAGCAG ³	65.6	260
<i>S. tritici</i> , <i>S. nodorum</i>	SitsRs		GCAATGTGCGTTCAAAGATTC ³	65.5	-

Примечания: Здесь и далее в таблицах 1, 2, 3 - пары праймеров. Жирным шрифтом выделены праймеры, выбранные для разработки системы идентификации в формате FLASH. Tm рассчитана по программе Oligo 6,71.

Для региона рРНК были подобраны три пары праймеров на каждый вид

(табл. 1), в которых прямые видоспецифичные праймеры были гомологичны нуклеотидным последовательностям внутреннего транскрибируемого спейсера (Internal transcribed spacer 1, ITS1), а обратные праймеры, общие для двух видов, - 5,8S рРНК. Гомология нуклеотидных последовательностей ITS1 региона для обоих видов составляла 39%, а 5,8S — 94%.

Сконструированные праймеры были протестированы на изолятах видов *S. tritici* и *S. nodorum* из разных регионов России с помощью оптимизированной программы ПЦР (см. методы). При этом пары праймеров, дававшие перекрестную реакцию с ДНК другого вида, выбраковывались.

Из всех разработанных и протестированных пар праймеров для дальнейшей работы по подбору зонда и перевода системы в формат FLASH были выбраны StitsFs, SnitsFs и SitsRs.

Подбор и проверка ПЦР-зонда для флуоресцентной детекции видов *S. tritici* и *S. nodorum*

Для детекции продуктов ПЦР в формате FLASH, к консервативной области 5,8S рРНК амплифицируемого фрагмента был подобран общий для двух видов зонд SNitsT, сконструированный по типу «молекулярного маячка»: 5' - (BHQ1) CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGCG (FAM) - 3', где подчеркиванием отмечена часть зонда, комплементарная последовательности матричной ДНК. Два не подчеркнутых нуклеотида были добавлены для стабилизации стебля и придания зонду характерной вторичной структуры.

При тестировании зонда SNitsT с праймерами для *S. tritici*, специфичный сигнал флуоресценции был зафиксирован лишь в образце 7 без перекрестной реакции с ДНК других видов (рис. 1А). С праймерами для *S. nodorum* флуоресценция наблюдалась только в образцах, содержащих ДНК изолятов вида *S. nodorum* (образцы 3, 4, 5 и 6, рис. 1Б). Значения флуоресценции зонда SNitsT в этих вариантах превышали значения фоновой флуоресценции в 2,1 раза и выше — такие показатели в протоколе детекции результатов ПЦР в формате FLASH фиксировались как достоверно положительные. Следует отметить, что при проведении ПЦР праймеры, специфичные к видам *S. tritici* и *S. nodorum*, не давали перекрестной реакции с ДНК пикнидиального гриба, отнесенного по результатам морфологического анализа к роду *Phoma*.

Во всех вариантах значения флуоресценции зонда ВК превышали в 2.5 раза уровень его фоновой флуоресценции, что свидетельствовало об отсутствии ингибирования ПЦР. В вариантах, где наблюдалось образование специфичного продукта ПЦР, сигнал ВК был меньше в несколько раз, по сравнению с вариантами, в которых образование специфического продукта не происходило.

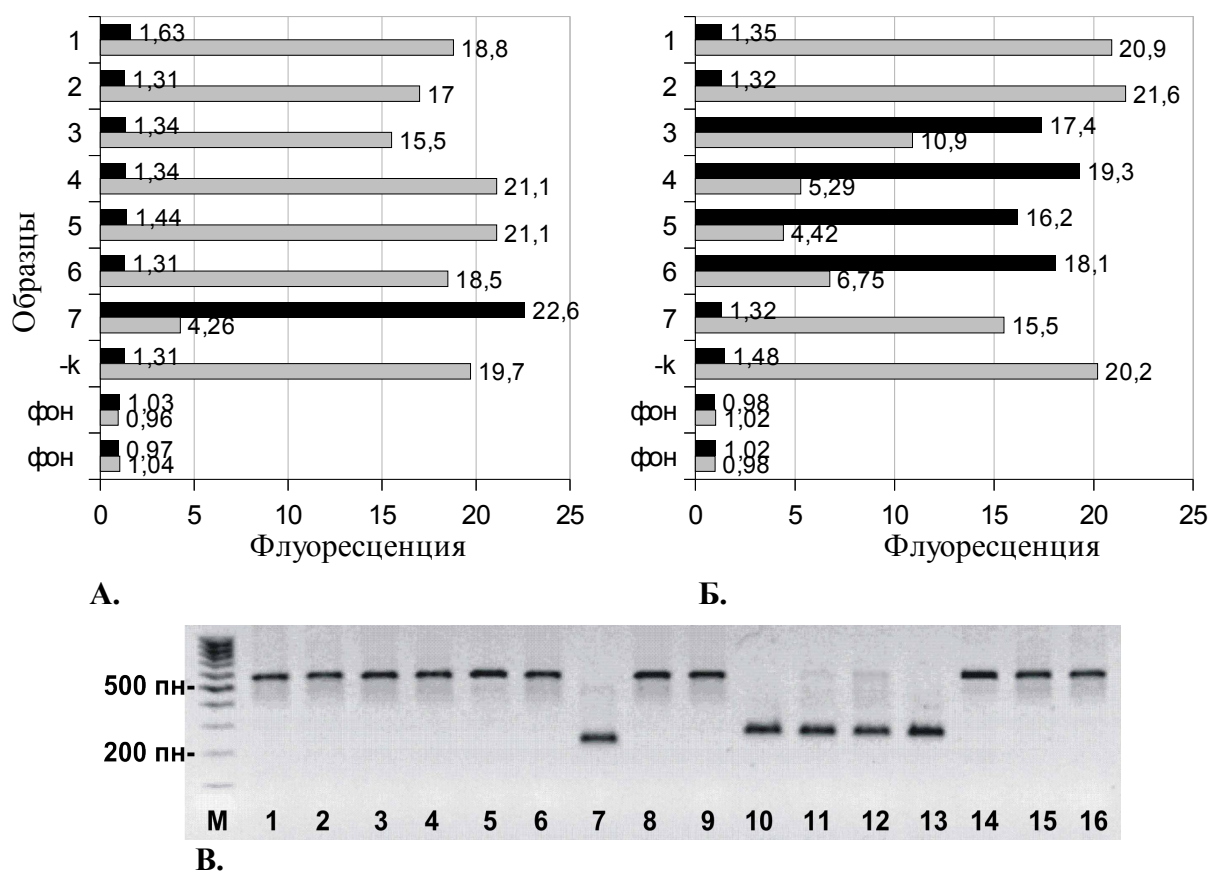


Рис. 1. Результаты тестирования зонда SNitsT методом FLASH-ПЦР с праймерами для *S. tritici* (А) и *S. nodorum* (Б) и анализ полученных продуктов методом электрофореза (В)

Черные столбцы - сигнал в результате специфической реакции, серые — ВК. Значения флуоресценции указаны справа от столбцов (А, Б). Образцы № 1-7, -к (А) соответствуют дорожкам № 1-7, 15 (В), а образцы № 1-7, -к (Б) - дорожкам № 8-14, 16 (В): **1, 2, 8, 9** – пикнидиальный гриб рода *Phoma*; **3, 4, 10, 11** – *S. nodorum* изолят В 1/13; **5, 6, 12, 13** – *S. nodorum* В-28/ КГЗ; **7, 14** – *S. tritici* В-35/ЧИ-1; **15, 16** – отрицательный контроль. **М** - маркер молекулярного веса для ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н. ПЦР-продукт длиной 560 п.н. - ВК

В результате анализа продуктов FLASH-ПЦР в образце 7 (рис. 1А), а также в образцах 3, 4, 5, 6 (рис. 1Б) методом электрофореза в 2,5 % геле было показано наличие амплифицированных фрагментов ДНК длиной около 250 п.н. на дорожках 7 и 10, 11, 12, 13, соответственно (рис. 1В). Продукт амплификации ВК длиной приблизительно 560 п.н. в этих образцах присутствовал в следовых количествах.

Таким образом, для идентификации видов *S. tritici* и *S. nodorum* разработаны праймеры и зонд, которые могут послужить основой для создания стандартных наборов для диагностики.

Подбор праймеров для идентификации видов *F. graminearum*,

***F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*,
F. langsethiae и проверка их видоспецифичности**

Для разработки наиболее эффективных праймеров для идентификации исследованных в настоящей работе видов рода *Fusarium* в качестве целевой ДНК матрицы был выбран ген фактора элонгации трансляции 1-альфа (*tefla*), кодирующий белок, вовлеченный в процесс регуляции трансляции. Ген *tefla* широко используется в филогенетических исследованиях фузариевых грибов, поскольку его нуклеотидные последовательности высокоинформативны на уровне вида и неортологические его копии не были обнаружены для видов рода *Fusarium*. Кроме того, на основе последовательностей данного гена была создана база данных FusariumID, которую используют для идентификации видов этого рода, сравнивая полученные с помощью универсальных праймеров последовательности с депонированными в ней. Таким образом, нуклеотидная последовательность гена *tefla* у видов рода *Fusarium* хорошо изучена (Geiser et al., 2004). Кроме того, ген *tefla* представлен в геноме единственной копией (Kristensen et al., 2005, 2007).

Гомология нуклеотидных последовательностей гена *tefla*, заимствованных из ГенБанка, у видов *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae* и *F. langsethiae* составляла около 53%. Полиморфные для данных видов области гена *tefla* были использованы в качестве 3'-участков при конструировании праймеров (табл. 2).

Праймеры для видов *F. graminearum* и *F. culmorum* фланкировали участок гена *tefla* длиной около 340 п.н., внутри которого также были подобраны праймеры для видов *F. avenaceum* и *F. tricinctum*, ограничившие регион длиной 240 п.н. Для видов *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* при анализе нуклеотидных последовательностей гена *tefla* были выявлены полиморфные сайты, фланкирующие участок длиной около 330 п.н., к которым для этих видов были подобраны прямые и обратные праймеры.

Локусы, гомологичные праймерам и зондам, были соотнесены со структурой гена *tefla*. На основании этого было показано, что прямые праймеры для видов *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum* гомологичны к участку интрона 2, обратные праймеры для этих видов - экзона 4, а зонды гомологичны области экзона 3. Прямые праймеры для видов *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* локализованы на участках интрона 1, а обратные праймеры и зонд гомологичны к областям интрона 2 гена *tefla* (рис. 2). Таким образом, большая часть олигонуклеотидов была подобрана нами к нуклеотидным последовательностям интронов.

Таблица 2. Праймеры, подобранные для молекулярной идентификации видов рода *Fusarium*

Вид	Название	Последовательность (5'→3')	Tm	Ампликон, п.н.
<i>F. graminearum</i>	fGtefF	GGCTTTGTCGTAATTTTTTTCCC	69	340
	fGtefR	GACCGGGAGCGTCTGATAGC	69.1	
	GRMtR2	CGGGAGCGTCTGATAGCCA	68.9	
<i>F. culmorum</i>	fCtefF	CGGCTTTGTCGTAATTTTTCTGG	70.6	340
	fCtefR	GTGACCGGGAGCGTCTGATAGT	70.2	
	CULtR2	CGGGAGCGTCTGATAGTCG	65.9	
<i>F. tricinctum</i>	fTtefF	CACCCTGTCGCGCACTACA	68	240
	fTtefR	TGTTAGCATGATGCAAGCATGATA	68.5	
<i>F. avenaceum</i>	fAtefF	TTACCACACTGTCGCGCACTAT	68.1	240
	fAtefR	TTAGCATGATGAAGGCATGGTG	68.3	
<i>F. sporotrichioides</i>	fStefF	GCGGGGTAGTTTCAATCATCATT	69.6	330
	fStefR	TGGATGTGTGGGAAGGGCAA	71.1	
	fStefR2	AAATGGATGTGTGGGAAGGGC	70.5	
<i>F. poae</i>	fPtefF	CTTTGACATGGCGGGGTAGAC	69.1	320
	fPtefR	CGCGCCCAAAGAAATGCAA	72.4	
<i>F. langsethiae</i>	fLtefF	CGGGGTAGTTTCAATCGTCATC	68.4	320
	fLtefR	GTAATGGCTATGTGGGAAGGAA	67.7	

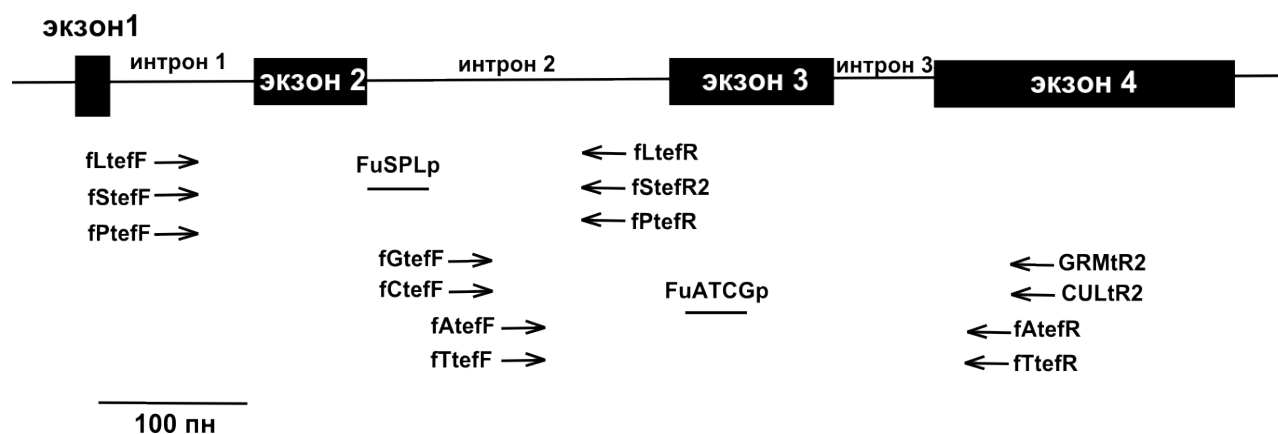


Рис. 2. Схематическое изображение гена *tefla* грибов рода *Fusarium* с указанием локализации праймеров и зондов, сконструированных для идентификации исследуемых видов

Для того чтобы оценить эффективность подобранных пар праймеров их

тестировали с ДНК изолята того вида, к которому они были подобраны, а затем проверяли специфичность праймеров, проводя тестирование на ДНК изолятов всех других видов рода *Fusarium*. Для проведения ПЦР использовали оптимизированную универсальную программу с температурами отжига 64°C/67°C/70°C: (93°C - 90 сек) - 1 цикл; (93°C - 20 сек, 64°C/67°C/70°C - 10 сек) – 5 циклов; (93°C - 1 сек, 64°C/67°C/70°C - 10 сек) – 40 циклов. Праймеры, дававшие помимо амплификации целевого продукта перекрестную реакцию с ДНК изолятов других видов, выбраковывались.

Например, при проведении ПЦР с праймерами fGtefF и fGtefR для вида *F. graminearum*, наряду с образованием ПЦР-фрагментов с ДНК изолятов вида *F. graminearum* длиной около 350 п.н., наблюдалась перекрестная реакция с ДНК изолята 46504 вида *F. culmorum* с образованием ампликона той же длины (данные не приводятся). При тестировании комбинации праймеров fGtefF и GRMtR2 с ДНК изолятов вида *F. graminearum* были получены фрагменты ожидаемой длины (рис. 3), а с изолятами остальных шести видов перекрестной реакции не наблюдалось. Именно такая пара праймеров отбиралась для разработки тест-системы. При этом учитывалось образование ПЦР-фрагментов ВК длиной около 560 п.н., что указывало на отсутствие ингибирования реакции в исследуемых образцах.

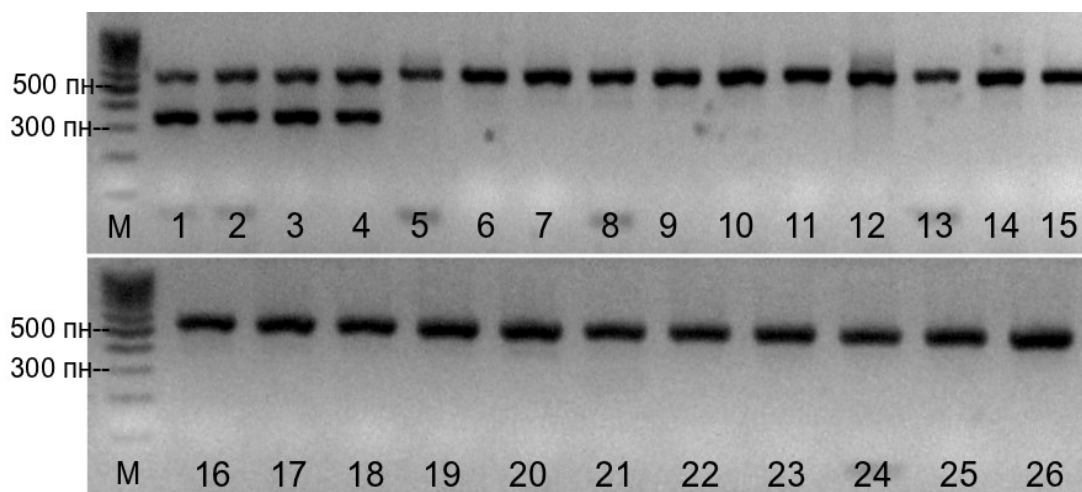


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами fGtefF и fGtefR2 для вида *F. graminearum*

Изоляты *F. graminearum* (дорожки 1 – 4), *F. culmorum* (5 – 7), *F. sporotrichioides* (8-10), *F. tricinctum* (11, 13 – 15), *F. poae* (16 – 20), *F. avenaceum* (12, 21 – 25): 1 – изолят 48900, 2 — 41806, 3 — G.8-8, 4 – 41807, 5 – 61916, 6 – 46504, 7 – 37031, 8 – 33100, 9 – 4700, 10 – 2у-1, 11 – 50202, 12 – T48301, 13 – Fin-2/2, 14 – 60602, 15 – T52304, 16 – 33, 17 – 40101, 18 – 55202, 19 – 47401, 20 – 61701, 21 – A7194, 22 – A7225, 23 – A7244, 24 – A7192, 25 – A7196, 26 – отрицательный контроль. М — маркер молекулярного веса для ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н. ПЦР-фрагмент длиной 560 п.н. - ВК. Температура отжига праймеров 67°C

При тестировании праймеров fAtefF и fAtefR для вида *F. avenaceum*, с ДНК изолятов этого вида, а также с ДНК изолята T48301 вида *F. tricinctum*, были получены ПЦР-продукты длиной около 240 п.н. По результатам повторного анализа морфологических признаков изолят T48301 был отнесен к виду *F. avenaceum*. Несмотря на то, что виды *F. avenaceum* и *F. tricinctum* согласно существующей в настоящее время систематике фузариевых грибов относятся к разным секциям, существует мнение о близкородственности двух этих видов грибов и ошибочности размещения вида *F. tricinctum* в секцию *Sporotrichiella* (Marasas et al., 1984; Turner et al., 1998). Эти результаты наглядно демонстрируют неоспоримое преимущество разработанного подхода для четкой видовой идентификации исследованных видов возбудителей фузариозов.

В результате анализа из всех подобранных к исследуемым видам рода *Fusarium* пар праймеров были отобраны только по одной (указаны в таблице 2 жирным шрифтом), а именно те из них, которые позволяли получать специфичные продукты при проведении ПЦР по оптимизированной программе и не давали соответствующие ампликоны с ДНК других видов грибов.

Кроме того, нами были протестированы изоляты грибов рода *Fusarium*, выделенные из растений ячменя из разных регионов России, которые на основании морфологии колоний и конидий (Билай В.И. и др., 1990) были отнесены к виду *F. sporotrichioides*. ПЦР-анализ исследованных изолятов с разработанными нами праймерами, специфичными к данному виду, выявил принадлежность десяти из тринадцати изолятов к виду *F. sporotrichioides*. Видовую принадлежность трех изолятов уточняли, используя наборы разработанных нами праймеров, специфичных к *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* и *F. langsethiae*. В результате два изолята были идентифицированы как *F. tricinctum*, и один как *F. culmorum*.

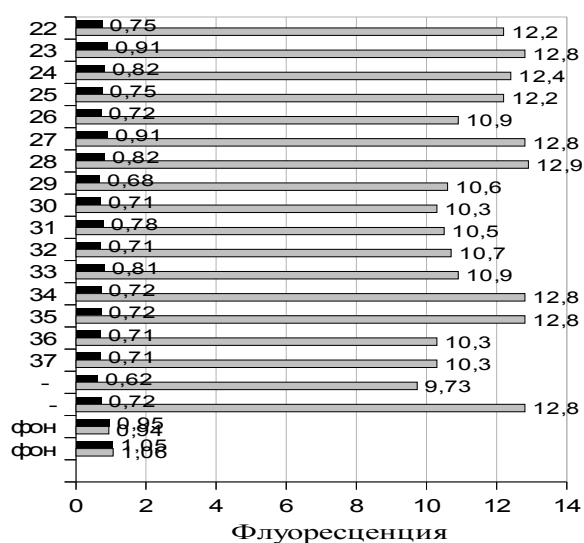
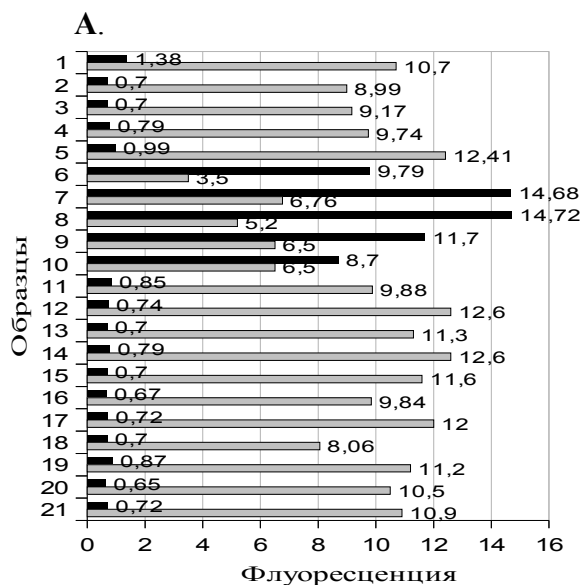
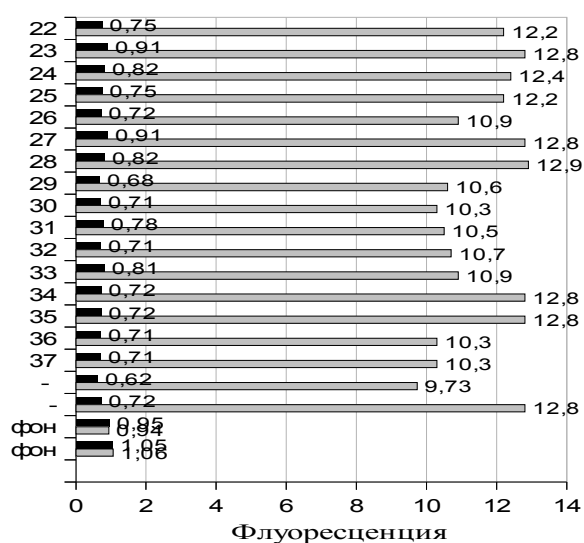
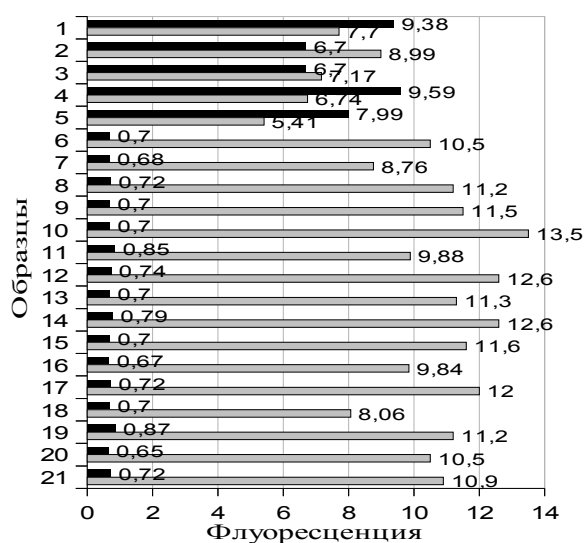
Таким образом, из приведенных выше данных можно сделать вывод о возможности применения разработанных нами праймеров не только в диагностических целях, но и, при необходимости, для определения или уточнения видовой принадлежности изолятов грибов рода *Fusarium*.

Подбор и проверка ПЦР-зондов для флуоресцентной детекции видов рода *Fusarium*

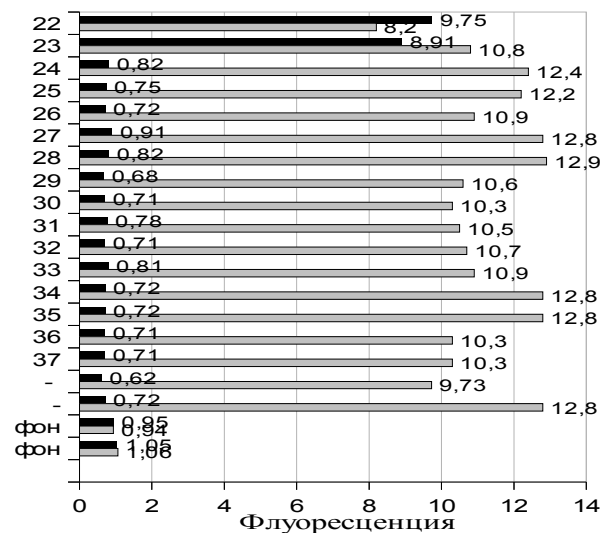
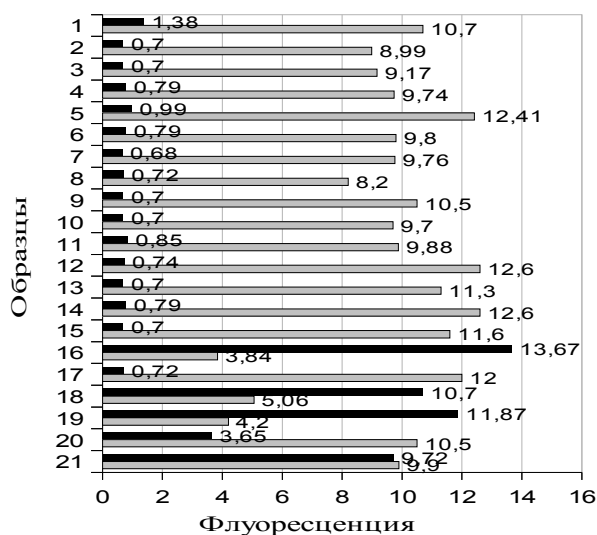
Для регистрации результатов ПЦР в формате FLASH на область гена *tef1a*, фланкированную видоспецифичными праймерами, для грибов *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum* и *F. avenaceum* был разработан общий зонд FuATCGp типа «молекулярный маячок»: 5' - (BHQ1) CCGAGCAATAGGAAGCCGCGAGCTCGG (FAM) - 3' (подчеркиванием

выделены нуклеотиды, комплементарные матричной ДНК). Пять не подчеркнутых нуклеотидов добавлены для стабилизации стебля и придания зонду характерной вторичной структуры.

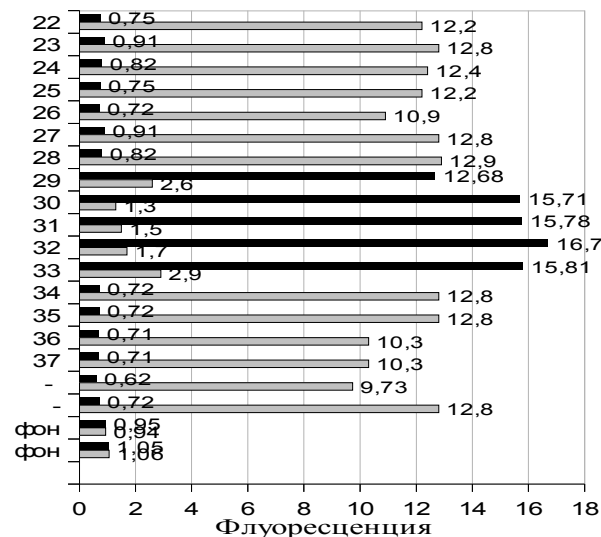
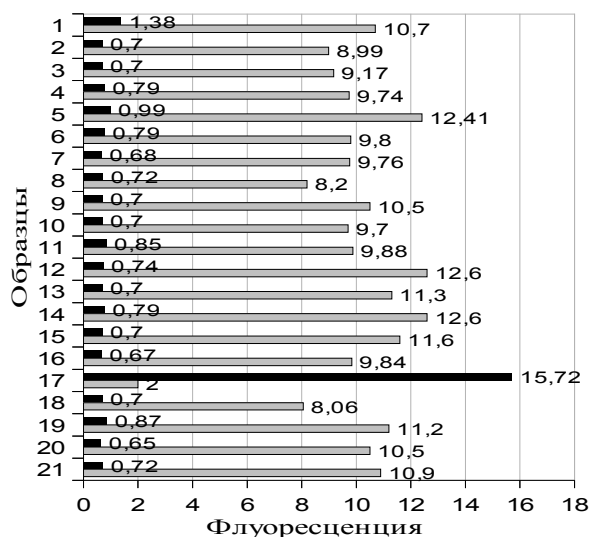
Эффективность зонда FuATCGp проверяли с парами праймеров (см. табл. 2) для видов *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum* и *F. avenaceum* на изолятах семи исследуемых видов (рис. 4). Как видно из рисунка, оптимальный уровень флуоресценции зонда FuATCGp, выше уровня фоновой флуоресценции в 2,1 раза и больше, наблюдался при концентрации зонда равной 7 пмоль. Уровень же фоновой флуоресценции этого зонда оказался равен 70,5 ед., то есть не превышал предельно допустимого значения в 150 ед. Следует подчеркнуть, что во всех вариантах ПЦР проходила специфично.



Б.



В.



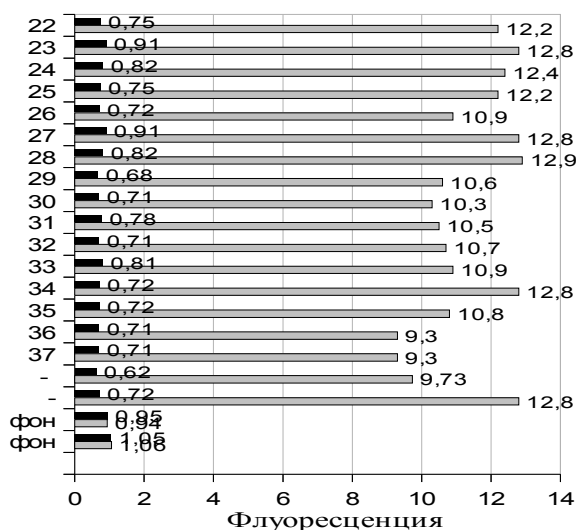
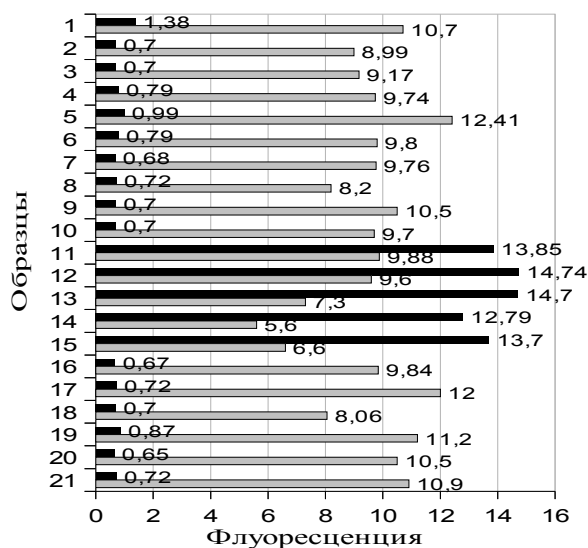
Г.

Рис. 4. Результаты детекции флуоресценции продуктов FLASH-ПЦР с праймерами для видов *F. graminearum* (А), *F. culmorum* (Б), *F. tricinctum* (В) и *F. avenaceum* (Г). Номера образцов соответствуют изолятам видов *F. graminearum* (1-5), *F. culmorum* (6-10), *F. sporotrichioides* (11-15), *F. tricinctum* (16, 18-24), *F. poae* (25-29), *F. avenaceum* (17, 30-34), *F. langsethiae* (35-38): 1 — G.8-8, 2 — 41807, 3 — 41806, 4 — 48900, 5 — 2903/1, 6 — 37031, 7 — 61916, 8 — 46504, 9 — g.255, 10 — 70517, 11 — 33100, 12 — 2y-1, 13 — 47000, 14 — 61501, 15 — 143201, 16 — T50202/1, 17 — T48301, 18 — Fin-2/1, 19 — 60602/1, 20 — T52304, 21 — 60602/2, 22 — 50202, 23 — Fin-2/2, 24 — 33, 25 — 40101, 26 — 55202, 27 — 47401, 28 — 61701, 29 — A7194, 30 — A7225, 31 — A7244, 32 — A7192, 33 — A7196, 34 — 1280/9822-219-1F, 35 — 1406/TMW1091, 36 — 54, 37 — 55201, «-» - отрицательный контроль, «фон» - пробирки, по которым измеряли уровень фоновой флуоресценции. По оси X - интенсивность флуоресценции относительно фона; черные столбцы - специфический сигнал, серые - ВК

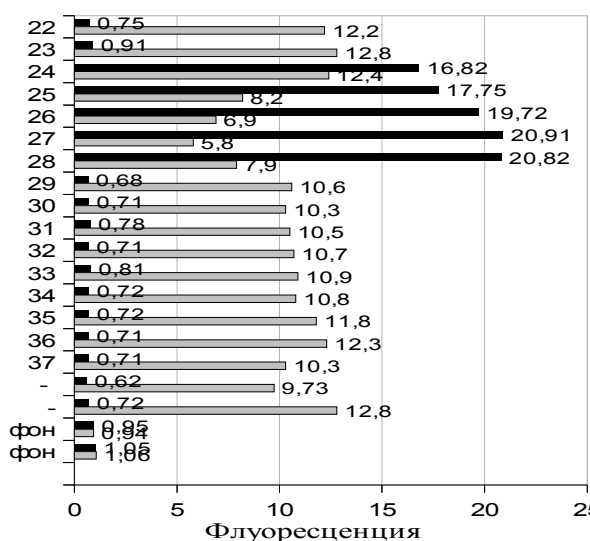
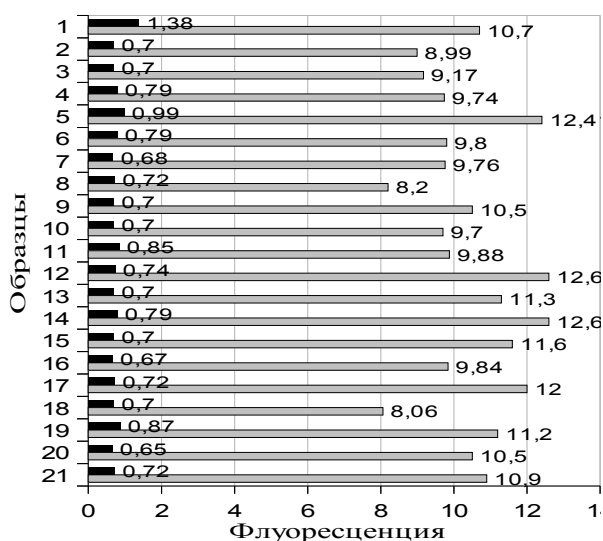
На участок гена *tefla*, фланкируемый праймерами для видов *F.*

sporotrichioides, *F. poae* и *F. langsethiae*, был подобран общий зонд FuSPLp 5' - (BHQ1) GCGCGATCGAGGAAAATGAGACCAACGCGC (FAM) – 3' (подчеркиванием выделены нуклеотиды, комплементарные матричной ДНК). Четыре не подчеркнутых нуклеотида добавлены для стабилизации стебля и придания зонду характерной вторичной структуры.

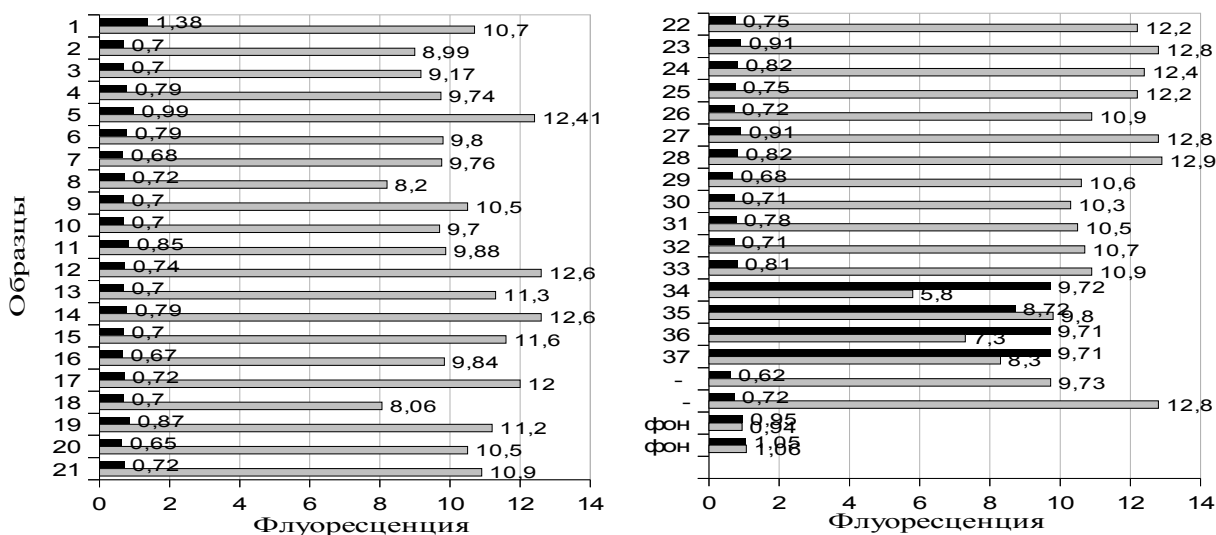
Тестирование зонда FuSPLp с праймерами, специфичными к видам *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* (рис. 5), и ДНК изолятов семи видов грибов рода *Fusarium* методом FLASH-ПЦР показало, что фоновый уровень флуоресценции не превышал максимального значения и был равен 50,5 ед. при оптимальной концентрации зонда в реакционной смеси 3,5 пмоль. При этом, образование продуктов реакции проходило строго специфично без перекрестной реакции с ДНК изолятов других видов.



А.



Б.



В.

Рис. 5. Результаты детекции флуоресценции продуктов FLASH-ПЦР с праймерами для видов *F. sporotrichioides* (А), *F. poae* (Б), *F. langsethiae* (В)

Номера образцов соответствуют изолятам видов *F. graminearum* (1-5), *F. culmorum* (6-10), *F. sporotrichioides* (11-15), *F. tricinctum* (16, 18-24), *F. poae* (25-29), *F. avenaceum* (17, 30-34), *F. langsethiae* (35-38): 1 — G.8-8, 2 — 41807, 3 — 41806, 4 — 48900, 5 — 2903/1, 6 — 37031, 7 — 61916, 8 — 46504, 9 — g.255, 10 — 70517, 11 — 33100, 12 — 2y-1, 13 — 47000, 14 — 61501, 15 — 143201, 16 — T50202/1, 17 — T48301, 18 — Fin-2/1, 19 — 60602/1, 20 — T52304, 21 — 60602/2, 22 — 50202, 23 — Fin-2/2, 24 — 33, 25 — 40101, 26 — 55202, 27 — 47401, 28 — 61701, 29 — A7194, 30 — A7225, 31 — A7244, 32 — A7192, 33 — A7196, 34 — 1280/9822-219-1F, 35 — 1406/TMW1091, 36 — 54, 37 — 55201, «-» - отрицательный контроль, «фон» - пробирки, по которым измеряли уровень фоновой флуоресценции. По оси X - интенсивность флуоресценции относительно фона; черные столбцы - специфический сигнал, серые - ВК

Разработанные нами видоспецифичные праймеры и зонды были использованы при создании наборов для идентификации возбудителей септориоза и фузариоза методом ПЦР с детекцией результатов в формате FLASH и в реальном времени (www.agrodiagnostica.ru).

Подбор праймеров для идентификации видов *P. graminis* и *P. striiformis* и проверка их видоспецифичности

В результате выравнивания и анализа нуклеотидных последовательностей региона рРНК для видов *P. graminis* и *P. striiformis* были разработаны две пары праймеров (табл. 3).

Анализ структуры рРНК показал, что прямые праймеры первой пары были подобраны на участок ITS1, обратные - на участок ITS2 рРНК. Было установлено, что прямые праймеры второй пары гомологичны участку ITS2, а общий для двух видов обратный праймер — 28S рРНК.

Оптимизацию программы ПЦР проводили за счет варьирования

температуры отжига в интервале 60°C — 67°C с использованием ДНК нескольких изолятов трех видов. Так, для праймеров ps180f и ps602r первой пары при температуре отжига 67°C амплификация проходила специфично с ДНК изолятов вида *P. striiformis*, а длина амплифицированного фрагмента соответствовала теоретически рассчитанной и составляла приблизительно 420 п.н. При тестировании пары праймеров pg98f и pg475r для *P. graminis* оптимальная температура отжига соответствовала 62°C: при этой температуре отжига реакция проходила специфично только с ДНК изолятов *P. graminis* с образованием ПЦР-продукта ожидаемой длины (около 370 п.н.). ПЦР с праймерами 2ps578f2 и 2psg753r для *P. striiformis* при температуре отжига 67°C проходила с образованием неспецифичного продукта. Амплификация с праймерами 2pg493f и 2psg753r для *P. graminis* при температуре отжига 67°C также была неспецифичной. Таким образом, в результате анализа полученных данных, для дальнейшей работы была отобрана пара праймеров ps180f — ps602r, специфичных для *P. striiformis*, и пара pg98f — pg475r - для *P. graminis*.

Таблица 3. Праймеры, разработанные для ПЦР-идентификации видов *P. graminis* и *P. striiformis*

Вид	Название	Последовательность (5'→3')	Tm	Ампли кон, п.н.
<i>P. striiformis</i>	ps180f	GCAATTGAGTAGACGTAАСТТСТ ¹	60.6	420
	ps602r	ТААGATGGCAGTATTGCTAAA ¹	58.6	
	2ps578f	АТТТТАТСАТСАСАТСААGГАТТ ²	60.4	175
	2psg753r	ТАGТААСGGCGAGTGAAGAG ²	60.4	
<i>P. graminis</i>	pg98f	GCTCGACTCTCTTATAAACCAA ¹	59.1	370
	pg475r	СААСАТССААТАААСАААТТАТТА ¹	60.0	
	2pg493f	GGATGTTGAGTGTGCTATAАТТАТ ²	62.6	260
	2psg753r	ТАGТААСGGCGAGTGAAGAG ²	60.4	

После оптимизации условий ПЦР, отобранные пары видоспецифичных праймеров, были протестированы на большем числе изолятов видов *P. striiformis*, *P. graminis* и *P. triticina*, собранных в основных регионах возделывания пшеницы в России. Так, с праймерами ps180f и ps602r для *P. striiformis* при температуре отжига 67°C амплификация проходила строго

специфично только с изолятами этого вида (рис. 6) с образованием ПЦР-продукта ожидаемой длины (450 п.н.).



Рис. 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами для *P. striiformis*

Номера дорожек соответствуют номерам изолятов видов *P. triticina* (1-11), *P. striiformis* (12-19, 26), *P. graminis* (20-25, 27-30): 1 – 591-6, 2 – 605-5, 3 – 610-1, 4 – 625-3, 5 – 615-1, 6 – 627-3, 7 – 621-4, 8 – 729-1, 9 – 730-1, 10 – 732-5, 11 – 737-5, 12 – 13-86, 13 – 12-05, 14 – 11-86, 15 – 2-04, 16 – 40-04, 17 – 41-01, 18 – 3-02-08, 19 – 5-06-08, 20 – 104-86, 21 – 134-86, 22 – 146-86, 23 – 210-86, 24 – 400-01-2, 25 – 225-87, 26 – 49-87, 27 – 300-20, 28 – 507-04, 29 – 300-1, 30 – 735-3, 31- отрицательный контроль. М — маркер молекулярного веса для ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н.

ПЦР с праймерами pg98f и pg475r, специфичными для *P. graminis*, при температуре отжига 62°C проходила с образованием продукта длиной около 370 п.н. только с ДНК изолятов *P. graminis* (рис. 7).

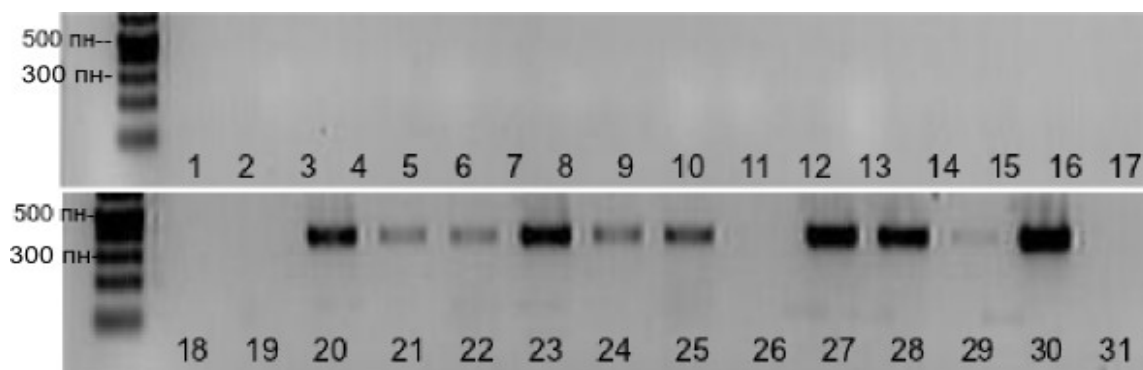


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов с праймерами для *P. graminis*

Номера дорожек соответствуют номерам изолятов видов *P. triticina* (1-11), *P. striiformis* (12-19, 26), *P. graminis* (20-25, 27-30): 1 – 591-6, 2 – 605-5, 3 – 610-1, 4 – 625-3, 5 – 615-1, 6 – 627-3, 7 – 621-4, 8 – 729-1, 9 – 730-1, 10 – 732-5, 11 – 737-5, 12 – 13-86, 13 – 12-05, 14 – 11-86, 15 – 2-04, 16 – 40-04, 17 – 41-01, 18 – 3-02-08, 19 – 5-06-08, 20 – 104-86, 21 – 134-86, 22 – 146-86, 23 – 210-86, 24 – 400-01-2, 25 – 225-87, 26 – 49-87, 27 – 300-20, 28 – 507-04, 29 – 300-1, 30 – 735-3, 31- отрицательный контроль. М — маркер молекулярного веса для ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н.

Таким образом, продемонстрировано, что в предложенной нами системе прямые и обратные пары праймеров амплифицируют полиморфные участки только соответствующих видоспецифических последовательностей нуклеотидов ДНК *P. striiformis* и *P. graminis*, что обеспечивает четкость и надежность получаемых результатов при диагностике и видовой идентификации этих патогенов. При необходимости возможен перевод системы в формат FLASH-ПЦР и ПЦР в реальном времени.

ВЫВОДЫ

1. В результате выравнивания и анализа нуклеотидных последовательностей генов возбудителей септориоза, фузариозов и ржавчины зерновых культур были выявлены полиморфные участки, использованные для разработки видоспецифичных праймеров.
2. Разработанные праймеры позволяют проводить высокочувствительную видовую диагностику всех исследованных видов грибов методом ПЦР.
3. Для возбудителей септориоза и фузариозов сконструированы зонды, позволяющие проводить детекцию результатов ПЦР и в формате FLASH, что существенно сокращает время анализа и снижает риск контаминации рабочей зоны продуктами амплификации.
4. На основе сконструированных праймеров и зондов тест-системы для диагностики исследованных возбудителей септориоза и фузариозов внедрены в производство на базе ЗАО «НПФ ДНК-Технология».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется применение разработанных систем идентификации для уточнения результатов диагностики, проводимой по симптомам в полевых условиях, для проверки видовой принадлежности выделяемых в чистую культуру изолятов грибов, а также для изучения патогенеза указанных видов.
2. Возможность перевода систем детекции возбудителей септориоза и фузариозов в формат ПЦР в реальном времени может быть использована при необходимости количественного определения патогена в образце, например при сравнении толерантных и восприимчивых сортов.
3. Описанные для разработок тест-систем методические подходы могут быть использованы для создания аналогичных ПЦР диагностикумов и на другие фитопатогены.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Абрамова, С. Л.** Диагностика фитопатогенных грибов *Septoria tritici* и *Stagonospora nodorum* методом FLASH-ПЦР / С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, Т. М. Воинова, С. К. Завриев // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - №. 1. - С. 107–113.
2. **Абрамова, С. Л.** Видовая идентификация изолятов из полевых образцов грибов рода *Fusarium* / С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, А. А. Стахеев, С. К. Завриев // Вестник РАСХН. - 2011. - № 2. - С. 56-57.
3. **Абрамова, С. Л.** Идентификация возбудителей ржавчины пшеницы методом полимеразной цепной реакции / С. Л. Абрамова, А. И. Жемчужина, Н. С. Жемчужина, Д. Ю. Рязанцев, С. К. Завриев // Вестник РАСХН. - 2011. - № 5. - С. 15-17.
4. Рязанцев, Д. Ю. Диагностика токсигенных грибов рода *Fusarium* методом FLASH-ПЦР / Д. Ю. Рязанцев, **С. Л. Абрамова**, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - №. 6. - С. 799–807.
5. Рязанцев, Д. Ю. ДНК-технологии для диагностики и идентификации токсигенных патогенов зерна и продуктов его переработки / Д. Ю. Рязанцев, **С. Л. Абрамова**, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев // Биотехнология. Вода и пищевые продукты: Материалы международной научно-практической конференции, 11-13 марта 2008 г., Москва. С. 364-365.
6. Рязанцев, Д. Ю. Детекция токсигенных грибов рода *Fusarium* / Д. Ю. Рязанцев, **С. Л. Абрамова**, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев // 50 лет на страже продовольственной безопасности страны: сб. трудов. - Большие Вяземы: ГНУ ВНИИФ, 2008. - С. 250-257.