

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ СЕМЯН ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ НА ЭКСПОРТ

Е. Р. Ручков, младший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии, egorruchkov1966@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-1002-8010;

Д. И. Шухин, младший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии, dmitriq.shukhin@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-3946-3400;

А. А. Кузнецова, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии, ORCID ID: 0000-0001-8443-2641;

М. Б. Копина, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, начальник научно-методического отдела микологии и гельминтологии, ORCID ID: 0000-0002-1613-1764

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»,

140150, Московская обл., г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32 а

Россия занимает лидирующее положение среди крупнейших производителей и экспортеров пшеницы. Одними из ключевых требований к биологической безопасности отечественной зерновой продукции являются фитосанитарные требования стран-импортеров. В отношении фитопатогенных микромицетов соответствие зерновой продукции определяется их полным отсутствием или минимально допустимым содержанием в партии. При отгрузке экспортируемой продукции необходимо в сжатые сроки проводить фитосанитарную оценку партии растительной продукции. В статье оценено влияние предложенного метода пробоподготовки семян зерновых культур на качество экстрагируемой ДНК грибных возбудителей. Целью проводимых исследований являлась оптимизация методов пробоподготовки зерновой продукции к экстракции нуклеиновых кислот с дальнейшей идентификацией для сокращения проведения лабораторных исследований. Разработка современных, достоверных и низкотрудозатратных методов диагностики фитопатогенов в растительной продукции представляется актуальной задачей. Для исследования зерно пшеницы, ячменя и ржи искусственно инокулировали такими грибными патогенами, как *Parastagonospora nodorum* – возбудитель септориоза колоса и *Alternaria infectoria* – возбудитель альтернариоза. Заражение производили путем замачивания зерна в суспензии спор с последующей инкубацией. Для оценки заражения использовали классические методы микологии, а также запатентованный метод Е. Ю. Тороповой. Идентификацию патогенов проводили методом классической ПЦР с использованием специфичных для целевых объектов праймеров. Дана оценка чувствительности предложенного метода экстракции для каждой из исследуемых зерновых культур. Метод позволяет выявлять целевые объекты даже при минимальном количестве пораженных зерен в образце (1–5 зараженных семян на 195–199 здоровых). Сопутствующие патогены не выявлены, при проведении ПЦР-анализа ложноположительные результаты получены не были.

Ключевые слова: зерно, выделение ДНК, фитопатогены, септориоз колоса, альтернариоз зерновых.

Для цитирования: Ручков Е. Р., Шухин Д. И., Кузнецова А. А., Копина М. Б. Особенности диагностики семян зерновых культур, предназначенных на экспорт // Зерновое хозяйство России. 2022. Т. 14, № 3. С. 44–50. DOI: 10.31367/2079-8725-2022-81-3-44-50.



THE FEATURES OF DIAGNOSTICS OF GRAIN CROP SEEDS INTENDED FOR EXPORT

E. R. Ruchkov, junior researcher of the research and methodological department of mycology and helminthology, egorruchkov1966@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-1002-8010;

D. I. Shukhin, junior researcher of the research and methodological department of mycology and helminthology, dmitriq.shukhin@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-3946-3400;

A. A. Kuznetsova, senior researcher of the research and methodological department of mycology and helminthology, ORCID ID: 0000-0001-8443-2641;

M. B. Kopina, Candidate of Agricultural Sciences, senior researcher, head of the research and methodological department of mycology and helminthology, ORCID ID: 0000-0002-1613-1764

Federal State Budgetary Institution "All-Russian Center for Plant Quarantine" (FGBU "VNIICR"), 140150, Moscow region, Ramenskoye district, Bykovo, Pogranichnaya Str., 32

Russia occupies a leading position among the largest wheat producers and exporters. One of the key requirements for the biological safety of domestic grain products is the phytosanitary requirements of importing countries. The conformity of grain products with regard to phytopathogenic micromycetes is determined by their complete absence or the minimum content in the batch. When shipping exported products, it is necessary to carry out a phytosanitary estimation of a batch of plant products in a short time. In the current paper there has been estimated the effect of the proposed method of sample preparation of grain crop seeds on the quality of an isolated fungal pathogens' DNA. The purpose of the study was to optimize the methods of sample preparation of grain products for the extraction of nucleic acids with further identification to reduce laboratory trials. The development of modern, reliable and low labor-consuming methods for diagnosing phytopathogens in plant products is of great urgency. In order to conduct the current research, wheat, barley and rye kernels were artificially inoculated with such fungal pathogens as Para-

stagonospora nodorum, the causative agent of Septoria leaf spot, and *Alternaria infectoria*, the causative agent of Alternaria leaf spot. The infection was carried out by soaking the kernels in a spore suspension followed by incubation. In order to assess infection, there were used the classical methods of mycology, as well as the patented E. Yu. Tоропова's method. The pathogens were identified by a classical PCR analysis using the target-specific primers. There has been given an assessment of the sensitivity of the proposed extraction method for each of the studied crops. The method allows identifying target objects even with a minimum number of infected kernels in the sample (1–5 infected seeds per 195–199 healthy ones). There were not identified any related pathogens, and there were no false-positive results during the conducted PCR analysis.

Keywords: kernels, DNA isolation, phytopathogens, *Septoria spot of a head*, *Alternaria spot of grain crops*.

Введение. Россия – один из основных экспортеров зерна на мировом рынке. Так, за последние три года ежегодно экспортируется отечественной зерновой продукции более чем на 7 млрд долларов США (Таможенная статистика внешней торговли РФ, 2021). Для сохранения ключевых позиций в мировой торговле необходимо производить высококачественное зерно, удовлетворяющее требованиям и стандартам качества стран-импортеров. В каждой стране назначения существуют требования к подкарантинной продукции, согласно которым зерновая продукция должна быть свободна от ряда вредных организмов. Удовлетворение этих требований возможно при оперативных выявлении карантинных организмов при производстве и транспортировке зерна. Используемые методы исследований подкарантинной зерновой продукции, основанные на диагностике возбудителей болезней зерновых культур по культурально-морфологическим признакам, продолжительны и трудоемки. Такой подход не обеспечивает оперативность исследований больших объемов продукции. Введение в исследование зерна молекулярно-генетических методов позволяет ускорить и повысить точность идентификации патогенов зерновых культур. В настоящее время идентификация грибов-возбудителей болезней на основе ПЦР-анализа получила широкое распространение (Samson et al., 2019). Для проведения ПЦР традиционно используют ДНК, выделенную из чистых культур, получение которых продолжительно. Выделение ДНК патогенов напрямую из зерновой продукции позволит ускорить исследования. Однако этот процесс имеет определенные особенности, влияющие на точность результата анализа. Вместе с ДНК при экстракции в раствор попадают различные полисахариды, алкалоиды, фенольные соединения, которые снижают качество ДНК (Рябушкина и др., 2012). Экстракцию ДНК из растительных материалов осуществляют с помощью различных буферных растворов и химических соединений. При выделении ДНК из зерна следует помнить, что грибная инфекция зачастую находится внутри семени, поэтому для ее экстракции в буфер необходимо механически разрушить зерно. Целью проводимых исследований являлась оптимизация методов пробоподготовки зерновой продукции к экстракции нуклеиновых кислот с дальнейшей идентификацией для сокращения проведения лабораторных исследований.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись семена ос-

новных зерновых культур: пшеницы, ячменя, ржи.

Получение инфекционного материала проводили с помощью искусственного заражения зерна двумя изолятами фитопатогенных грибов: *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous, 2013 – возбудитель септориоза колоса зерновых, и *Alternaria infectoria* E.G. Simmonds, 1986 – возбудитель альтернариоза зерновых.

Суспензии грибов готовили следующим образом: мицелий со спорами снимали с колонии гриба на чашке Петри и помещали в стерильную дистиллированную воду. Зерно пшеницы, ячменя и ржи предварительно промывали проточной водой, затем прогревали в сушильном шкафу ШС-80-02 СПУ при 55 °C в течение 40 мин для подавления возможной инфекции в семенах. Затем зерно стерилизовали в течение 10 мин в 96%-м этаноле и дважды промывали в стерильной воде. Стерильные контейнеры для биоматериала заполняли на 2/3 объема зерном и наливали суспензию гриба так, чтобы она полностью покрывала зерно. Зерно с суспензией гриба оставляли на сутки в термостате MIR-254 при 24 °C, периодически перемешивая. Затем жидкость сливали, зерно раскладывали равномерно на стерильную фильтровальную бумагу и просушивали в ламинарном боксе проходящим воздухом. После высушивания зерно помещали обратно в контейнеры и оставляли в термостате на 3 суток при температуре 24 °C. По истечении этого времени зерно снова стерилизовали 96%-м спиртом в течение 10 мин, промывали стерильной водой и высушивали в ламинарном боксе, как описано выше.

Для анализа степени зараженности после высушивания зерно раскладывали на чашки Петри с 2%-м картофельно-морковным агаром (КМА) и инкубировали до появления мицелия *A. infectoria* на поверхности семян. Для выявления заражения *P. nodorum* использовали метод Тороповой Е.Ю., включающий в себя все необходимые этапы воздействия на гриб для начала спороношения, такие как чередование пониженных температур, ультрафиолетовое облучение. Продолжительность метода 14 суток (Торопова и др., 2016). Аналогичным образом готовили контрольные образцы с использованием здорового зерна, которое заливали стерильной водой. Образцы состояли из проб количеством от 50 до 200 семян разной степени зараженности (варианты с 1–5 инфицированными семенами; полностью зараженное зерно: зерно, зараженное пикнидами *P. nodorum*).

Пробоподготовку к экстракции ДНК из зерна проводили в три этапа.

1. Подготовка зерна к помолу. Перед помолом зерно промывали от механических загрязнений на поверхности под проточной водой от 5 до 15 мин в зависимости от степени загрязнения. За это время зерно способно напитаться влагой, которая будет препятствовать его качественному помолу. Для удаления лишней влаги зерно просушивали в сухожаровом шкафу при 45 °C до 6 ч.

2. Помол зерна проводили на лабораторной мельнице IKA Tube Mill control в специальной шлифовальной камере до образования частиц размером не более 0,5 мм.

3. Получение экстракта из муки при помощи 1%-го PBS буфера. Экспозиция муки в буфере составляла 2 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием суспензии встряхиванием. Затем суспензию центрифугировали при 5 тыс. об./мин в течение 3 мин. Для дальнейшего выделения ДНК отбирали 500 µl надосадочной жидкости в трехкратной повторности.

Экстракцию ДНК проводили коммерческим набором DNeasy Plant Pro (Qiagen, Германия).

Оценку качества и количества выделенной ДНК осуществляли на анализаторе NanoDrop 2000 и ПО NanoDrop.

Для определения степени ингибирования ПЦР при выделении ДНК из зерна использовали внутренний положительный контроль амплификации (ВПК): оригинальную разработанную систему праймеров Mus 714F/Mus 714R (Мазурин и др., 2012). Для идентификации вида *P. nodorum* использовали специфичные праймеры JB433/JB434, разработанные Beck and Ligon (1995). Выявление ДНК вида *A. infectoria* осуществляли с помощью специфичных праймеров Dir3Alta1/Inv4Alta1, предложенных Ravón et al. (2010).

Одна реакция объемом 25 µl содержала: 5 µl ПЦР-буфера Mas^{DD}Mix-2025 (Диалат лтд., Россия), 10 пмоль каждого праймера, 5 µl целевой ДНК, 2,5 µl ВПК и ddH₂O.

Температурно-временной режим на амплификаторе BioRad T100 составил: 94 °C – 3 мин, 40 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 1 : 0 мин; 1 цикл 72 °C – 7 мин. Режим амплификации для обоих исследуемых видов идентичный. После ПЦР проводили электрофорез в агарозном геле, визуализацию результатов осуществляли с помощью геледокументирующей системы Fusion Fx (Vilber Lourmat) и ПО EvolutionCapt версии 17.0.1.0.

Результаты и их обсуждение. Оптимизацию пробоподготовки зараженного семенного материала начинали с оценки степени искусственного заражения семян *P. nodorum* и *A. infectoria*.

На седьмые сутки инкубирования семян, зараженных *A. infectoria*, проявились характерные симптомы поражения грибом: оливковый налет конидий на зерне и рост оливкового мицелия на питательной среде (Simmonds, 2007).

Степень заражения семян *P. nodorum* определяли по методу, описанному Е. Ю. Тороповой. Через 14 суток на зерне появились пикниды гриба, содержащие характерные споры (рис. 1).



Рис. 1. Семена пшеницы с пикнидами *P. Nodorum*
Fig. 1. Wheat seeds with pycnidia *P. nodorum*

Для выделения ДНК целевых видов были апробированы несколько подходов к пробоподготовке образца (партии семян зерновых культур разного количества). В большинстве случаев исследуемая партия семян зерновой продукции представляет собой смесь здоровых и инфицированных зерен. Для выявления инфицированных семян из общей массы необходимо отбирать семена с симптомами, а в случае латентной инфекции прибегать к индуцированию спороношения возбудителей, используя соответствующие методы. Создание гомогенного образца с равной степенью инфицированности, например, помол зерна в муку, обеспечивает более равномерное распределение инфекции внутри него. В муке частота встречаемости пропагул фитопатогена увеличивается, что расширяет возможности метода идентификации.

При выделении геномной ДНК возбудителей напрямую из сухой муки существуют сложности экстракции НК. Разные образцы с частицами пылящей массы муки легко могут контаминировать друг друга, а также оседать на рабочую поверхность. Исключить эти отрицательные моменты позволяет использование экстрагирующих буферов, например, PBS, который обеспечивает большую гомогенность исследуемого образца.

Выделение ДНК напрямую из муки увеличивает вероятность выделения низкокачественной ДНК. Чаще всего для качественной оценки ДНК используют показатель A260/280, который отражает загрязнение раствора ДНК белками. Так, отношение $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ указывает на чистый образец ДНК (Glase, 1995, Russel, 2001). Выделенная ДНК из экстракта муки в PBS буфере обладала высоким качеством ($A_{260}/A_{280} 1,79-1,94$), а ее количество достаточно для проведения ПЦР (3,9–89,3 нг/µl) (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация и качество выделенной из экстракта муки геномной ДНК
Table 1. Concentration and quality of the genomic DNA isolated from flour extract

Вариант	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280
Зараженная пшеница	12,8–13,4	1,79–1,87
Зараженный ячмень	3,7–3,9	1,8–1,94
Зараженная рожь	86,1–89,3	1,82

От количества ДНК (концентрации) напрямую зависит эффективность ПЦР. Слишком низкие значения концентрации не позволяют провести ПЦР, так же, как и слишком высокие концентрации ДНК могут ингибировать реакцию.

Первым этапом апробации метода являлся анализ малого объема образца количеством от 30 до 50 семян. В опыте использовали зерно пшеницы, зараженное *P. nodorum*, а также здоровое зерно пшеницы, ячменя и ржи. Эффективность выделения ДНК оценивали в нескольких вариантах: здоровое зерно пшеницы + зараженное зерно пшеницы (1–3 зараженных семени на 47–49 здоровых); 25 здоро-

вых зерен ячменя + 5 инфицированных зерен пшеницы; 25 здоровых зерен ржи + 5 инфицированных зерен пшеницы; 50 инфицированных зерен пшеницы; 50 неинфицированных зерен пшеницы.

В результате проведения метода ПЦР со специфичными праймерами из экстрактов муки пшеницы, ячменя и ржи (рис. 2) были получены специфичные продукты размером 450 п.о. только в вариантах с пшеницей и рожью. В варианте с ячменем целевой продукт получен не был, это можно объяснить низкой концентрацией целевой ДНК. Наличие продукта ВПК во всех вариантах указывает на отсутствие ингибирования реакции.

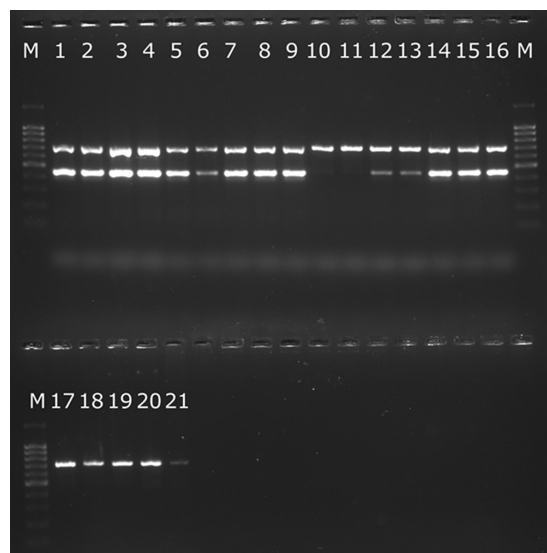


Рис. 2. Результаты электрофореза в агарозном геле ПЦР продуктов с праймерами JB 433/434 (Бэнды: 1–3 – 49 зд. зерен пшеницы + 1 инф.; 4–6 – 48 зд. + 2 инф.; 7–9 – 47 зд. + 3 инф.; 10–11 – 25 зд. зерен ячменя + 5 инф. пшеницы; 1–13 – 25 зд. зерен ржи + 5 инф. пшеницы; 14–16 К+з (только инф. зерно); 17–19 К-з (не инф. зерно); 20 – отрицательный контроль выделения ДНК; 21 – отрицательный контроль (вода))

Fig. 2. Results of electrophoresis in an agarose gel of PCR products with the primers JB 433/434 (Bands: 1–3 – 49 healthy wheat kernels + 1 infected one; 4–6 – 48 healthy + 2 infected; 7–9 – 47 healthy + 3 infected; 10–11 – 25 healthy barley kernels + 5 infected wheat kernels; 12–13 – 25 healthy rye kernels + 5 infected wheat kernels; 14–16 K + z (only infected kernels); 17–19 K - z (non-infected kernels); 20 – negative control for DNA isolation; 21 – negative control (water))

Размер образца для исследования был увеличен до 200 семян согласно ГОСТ № 12044-93, который устанавливает размер образца для исследований зерна на наличие патогенов 200–400 семян. На этом этапе важно учесть тот факт, что увеличение количества семян влечет увеличение количества растительной ДНК, а также веществ, способных ингибировать реакцию.

Из-за неудовлетворительных результатов с ячменем в предыдущем эксперименте было

решено увеличить инфекционный фон в образце, в связи с чем к 200 семенам ячменя добавили 5 пикнид гриба *P. nodorum*, а затем произвели помол. Для пшеницы отобраны образцы размером 200 семян с разным количеством инфекции: 1–3 зараженных *P. nodorum* зерна пшеницы + 197–199 здоровых семян. Получение экстрактов, выделение ДНК и проведение ПЦР производили, как описано выше. Результаты электрофореза продуктов ПЦР (рис. 3) свидетельствуют о том, что размер образца 200 се-

мян также обеспечивает выявление ДНК *P. nodorum* во всех образцах. Образование прдукта ВПК указывает на отсутствие ингибирования реакции.

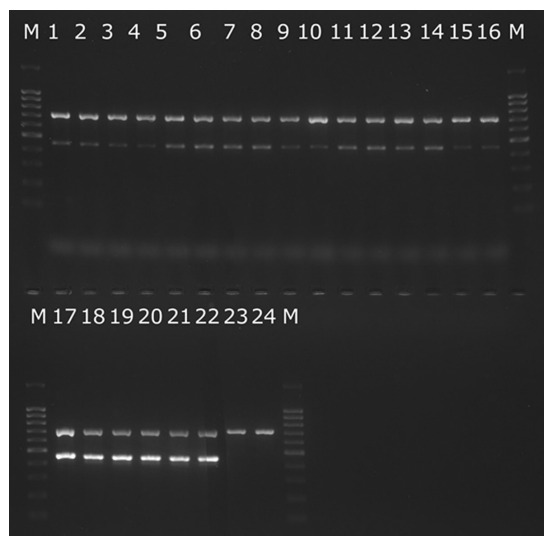


Рис. 3. Результаты электрофореза в агарозном геле ПЦР продуктов с праймерами JB 433/434 (Бэнды: 1–6 – 199 зд. зерен пшеницы + 1 инф.; 7–12 – 198 зд. + 2 инф.; 13–18 – 197 зд. + 3 инф.; 19–22 – 200 зд. зерен ячменя + 5 пикнид; 23 – отрицательный контроль выделения ДНК; 24 – отрицательный контроль (вода))

Fig. 3. Results of electrophoresis in an agarose gel of PCR products with the primers JB 433/434 (Bands: 1–6 – 199 healthy wheat kernels + 1 infected one; 7–12 – 198 health + 2 infected; 13–18 – 197 healthy + 3 infected; 19–22 – 200 healthy barley kernels + 5 pycnidia; 23 – negative control for DNA isolation; 24 – negative control (water))

Поскольку 5 пикнид является достаточно высоким инфекционным фоном, необходимо было оценить чувствительность метода. Для этого подготовили образцы, состоящие из 200 семян ячменя и с инфекционным фоном в 1–3 пикниды. Также для увеличения количества выделенной целевой ДНК к протоколу пробоподготовки семян ячменя был добавлен этап высокоскоростного центрифугирования экстракта при 13 тыс. об./мин. в течение 2 мин

для осаждения мелких частиц, в том числе кусочков мицелия гриба. Выделение ДНК проводили из полученного осадка, удалив надосадочную жидкость.

Результаты эксперимента представлены на электрофореграмме (рис. 4), специфичный продукт 450 п.о. образуется во всех повторностях с тремя пикнидами. В варианте с одной пикнидой продукт образуется в 3-х из 6 повторностей.

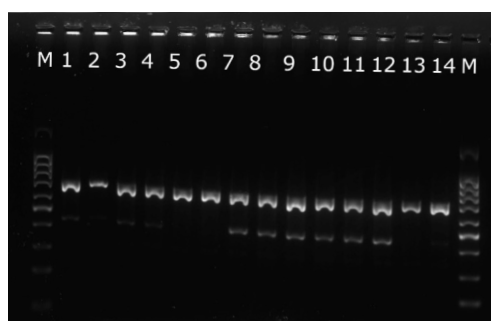


Рис. 4. Результаты электрофореза в агарозном геле ПЦР продуктов с праймерами JB 433/434 (Бэнды: 1–6 – 200 здоровых семян ячменя + 1 пикнида; 7–8 – 200 здоровых семян ячменя + 3 пикниды; 13 – отрицательный контроль выделения ДНК; 14 – отрицательный контроль (вода))

Fig. 4. Results of electrophoresis in an agarose gel of PCR products with the primers JB 433/434 (Bands: 1–6 – 200 healthy barley kernels + 1 pycnidia; 7–8 – 200 healthy barley kernels + 3 pycnidia; 13 – negative control of DNA isolation; 14 – negative control (water))

При выявлении *A. infectoria* в образцах зерновых культур также были получены положительные результаты ПЦР (рис. 5). Инфекционного фона в 5 зараженных семенах на 195 незараженных было достаточно

для детекции целевого вида во всех вариантах. Во всех случаях был получен целевой продукт размером 350 п.о., о качестве проведенной ПЦР говорит образование во всех вариантах продукта ВПК размером 700 п.о.

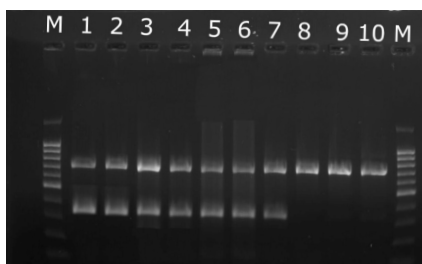


Рис. 5. Результаты электрофореза с праймерами Dir3Alta1/Inv4Alta1

(Бэнды: 1, 2 – 195 зд. семян пшеницы + 5 инф., 3, 4 – 195 зд. семян ячменя + 5 инф., 5, 6 – 195 зд. семян ржи + 5 инф., 7 – полностью зараженное зерно, 8 – не зараженное зерно, 9 – отрицательный контроль выделения ДНК, 10 – отрицательный контроль (вода))

Fig. 5. Results of electrophoresis with the primers Dir3Alta1/Inv4Alta1

(Bands: 1–2 – 195 healthy wheat kernels + 5 infected ones; 3–4 – 195 healthy barley kernels + 5 infected ones; 5–6 – 195 healthy rye kernels + 5 infected ones; 7 – completely infected kernels; 8 – not infected kernels; 9 – negative control of DNA isolation; 10 – negative control (water))

Выводы. Традиционные микологические методы фитосанитарных лабораторных исследований зерновой продукции продолжительны и занимают от 10 до 14 дней, поскольку основаны на идентификации по морфологическим структурам, конидиям, на образование которых требуется время и создание определенных условий инкубирования. Метод ПЦР-анализа не требует наличия диагностических морфологических структур патогена, идентификация производится по ДНК гриба, т.е. ее наличие в зерне указывает на инфицированность образца. Предложенный протокол пробоподготовки зерна к экстракции ДНК позволяет отказаться от инкубирования образцов, что сокращает продолжительность исследований до 5 дней в зависимости от исследуемого объекта. Было установлено, что данный метод

можно применять для пробоподготовки семян пшеницы, ячменя и ржи. Метод выделения ДНК фитопатогенных грибов из экстракта муки показал высокую чувствительность со всеми исследуемыми зерновыми культурами, которая составила одно зараженное семя на 199 здоровых для выявления *P. nodorum* и 5 зараженных семян на 195 здоровых для выявления *A. infectoria*. Пробоподготовка зерна к выделению ДНК по данному протоколу не требует дорогостоящего оборудования и опасных химических реактивов, поэтому может быть рекомендована для проведения лабораторных исследований. Применение данного метода позволяет быстро и надежно проводить лабораторные исследования на выявление фитопатогенов не только отечественной, но и экспортируемой зерновой продукции.

Библиографические ссылки

1. Анализ данных. Таможенная статистика внешней торговли РФ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://stat.customs.ru>.
2. Мазурин Е. С., Копина М. Б., Шероколава Н. А. Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2012. № 3. С 31–38.
3. Рябушкина Н. А., Омашева М. Е., Галиакпаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 2. С. 9–26.
4. Beck J. J., Ligon J. M. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat // Phytopathology. 1995. Vol. 85, № 3. P. 319–324.
5. Glasel J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios // Biotechniques. 1995. Vol. 18, № 1. P. 62–63.
6. Pavón M. Á. et al. PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1 // Food Control. 2010. Vol. 21, № 12. P. 1745–1756.
7. Russell D. W., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. Vol. 1. P. 112.
8. Samson R. A. et al. Food and Indoor Fungi. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2019.
9. Simmons E. G. *Alternaria*: an identification manual. Utrecht: Centralblatt für Schimmelpilzkulturen, 2007.

References

1. Analiz dannykh. Tamozhennaya statistika vneshnei trgovli RF [Data analysis // Customs statistics of foreign trade of the Russian Federation] [Elektronnyi resurs]. Rezhim dostupa: <http://stat.customs.ru>.
2. Mazurin E. S., Kopina M. B., Sherokolava N. A. Kontrol' dostovernosti rezul'tatov fitosanitarnoi ekspertizy pri ispol'zovanii molekulyarnykh metodov diagnostiki [Control of the reliability of the results of phytosanitary examination when using molecular diagnostic methods] // Vestnik Rossiiskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo. 2012. № 3. S. 31–38.
3. Ryabushkina N. A., Omashева M. E., Galiakparov N. N. Spetsifika vydeleniya DNK iz rastitel'nykh ob"ektov [Specifics of DNA extraction from plant objects] // Biotekhnologiya. Teoriya i praktika. 2012. № 2. S. 9–26.

4. Beck J.J., Ligon J.M. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat // *Phytopathology*. 1995. Vol. 85, № 3. P. 319–324.
5. Glasel J.A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios // *Biotechniques*. 1995. Vol. 18, № 1. S. 62–63.
6. Pavón M.Á. et al. PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker *Alt a 1* // *Food Control*. 2010. Vol. 21, № 12. P. 1745–1756.
7. Russell D. W., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. Vol. 1. P. 112.
8. Samson R.A. et al. *Food and Indoor Fungi*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2019.
9. Simmons E.G. *Alternaria: an identification manual*. Utrecht: Centralblatt fur Schimmelculturs, 2007.

Поступила: 09.02.22; доработана после рецензирования: 21.04.22; принята к публикации: 12.05.22.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют равные права на статью и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Ручков Е. Р., Шухин Д. И. – выполнение лабораторных опытов и сбор данных, их анализ и интерпретация; Кузнецова А. А., Копина М. Б. – концептуализация исследования, подготовка рукописи.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.