

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 632.911.2 : 632.4

ДЕТЕКЦИЯ *COLLETOTRICHUM COCCODES* С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2020 г. Д. Ю. Рязанцев^{1,*}, Е. М. Чудинова^{2,**}, Л. Ю. Кокаева^{3,4,***}, С. Н. Еланский^{2,3,****},
П. Н. Балабко^{3,*****}, Г. Л. Белов^{4,*****}, С. К. Завриев^{1,*****}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, 140052 Москва, Россия

*e-mail: d.yu.ryazantsev@gmail.com

**e-mail: chudiel@mail.ru

***e-mail: kokaeval@gmail.com

****e-mail: snelansky@gmail.com

*****e-mail: balabkopetr@mail.ru

*****e-mail: belov.grischa2015@yandex.ru

*****e-mail: szavriev@ibch.ru

Поступила в редакцию 10.01.2019 г.

После доработки 18.01.2019 г.

Принята к публикации 16.05.2019 г.

Фитопатогенный гриб *Colletotrichum coccodes* вызывает опасные заболевания картофеля и томата, известные как антракноз и черная пятнистость клубней. По морфологическим признакам их часто трудно отличить от заболеваний, вызываемых другими микроорганизмами; на зеленых плодах томата болезнь может протекать бессимптомно, проявляясь только на созревших красных плодах. Для быстрой и точной диагностики возбудителя предлагается тест-система для ПЦР в реальном времени. Для разработки тест-системы была определена последовательность нуклеотидов гена глицеролтрифосфатдегидрогеназы 45 штаммов *C. coccodes*, выделенных из клубней картофеля в разных регионах России. На основании полученных результатов и анализа аналогичных последовательностей других видов, имеющихся в базе данных GenBank, были сконструированы видоспецифичные для *C. coccodes* праймеры и зонды. Для проверки специфичности созданной тест-системы проводили ПЦР с ДНК, выделенной из чистых культур 15 различных видов паразитических и сапротрофных грибов, ассоциированных с растениями томата и картофеля (*Fusarium oxysporum*, *F. verticillium*, *Phomopsis phaseoli*, *Alternaria alternata*, *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Phellinus ferrugineovelutinus*, *Stemphylium vesicarium*, *Helminthosporium solani*, *Phomopsis phaseoli*, *Neonectria radicola*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* sp., *Cladosporium fulvum*, *C. cladosporioides*). Присутствие ДНК *Colletotrichum coccodes* определялось при пороговом цикле 20–27, тогда как остальные виды определялись после 40 циклов или не детектировались. Тест-система позволяет уверенно детектировать в анализируемой ПЦР-смеси концентрации ДНК *C. coccodes*, превышающие 0.01 нг/мм³. С помощью разработанной тест-системы было исследовано присутствие *C. coccodes* в листьях томата с симптомами поражения грибными болезнями и в клубнях картофеля без внешних симптомов заболевания. Листья с симптомами грибного поражения были собраны с двух разных полей в Краснодарском крае, клубни – с полей в Костромской, Московской, Калужской, Нижегородской областях. В Краснодарском крае был обнаружен один лист томата, содержащий ДНК *C. coccodes*; достоверное присутствие ДНК этого патогена было выявлено в 5 образцах клубней, выращенных в Костромской, Московской, Калужской областях.

Ключевые слова: видоспецифичные праймеры, ген глицеролтрифосфатдегидрогеназы, ПЦР, тест-система, фитопатогенные грибы

DOI: 10.31857/S0026364820010067

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Colletotrichum* – опасные фитопатогены, поражающие зерновые, овощные культуры, травы, многолетние плодовые и ягодные расте-

ния. Один из повсеместно распространенных видов этого рода, *Colletotrichum coccodes* (Wallr). Hughes, является возбудителем антракноза и черной пятнистости картофеля и томата, вызывает

заболевания и ряда других растений семейства пасленовые, в т.ч. сорных (Dillard, 1992). *C. coccodes* поражает все подземные части растения, основания стеблей, листья и плоды (Andrivon et al., 1998; Johnson, 1994). На кожуре инфицированных клубней картофеля наблюдается развитие серых пятен с нечетко выраженными краями, на которых хорошо видны черные точки спороношения и микросклероциев. В процессе хранения в мякоти клубней могут образоваться язвы с размягченным содержимым, т.е. болезнь переходит в фазу антракноза, что, однако, наблюдается крайне редко. В то же время симптомы антракноза (язвы, покрытые кожурой с мелкими черными точками) типичны на плодах томата. На листьях симптомы поражения *C. coccodes* выглядят как пятна темно-коричневого цвета, обычно окаймленные тканью желтого цвета (Johnson, 1994).

Развитие черной пятнистости на клубнях портит их внешний вид, что особенно выражено при продаже мытого картофеля краснокожурных сортов. Расслоение кожуры приводит к избыточному испарению и увеличению потерь при хранении (Hunger, McIntyre, 1979). Поражение других органов растений приводит к потерям урожая, что отмечалось в условиях как открытого, так и закрытого грунта (Johnson, 1994; Tsrar et al., 1999). Заболевания, вызываемые *C. coccodes*, распространены практически во всех картофелепроизводящих регионах мира, в том числе и в России (Leesa, Hilton, 2003; Belov et al, 2018). Контроль этих заболеваний затруднен из-за недостаточной эффективности существующих фунгицидов в отношении *C. coccodes* и отсутствия устойчивых сортов (Read, Hide, 1995).

Инокулюм *C. coccodes* может сохраняться в семенных клубнях (Read, Hide, 1988; Johnson et al., 1997), семенах томата (Ben-Daniel et al., 2010), выживать продолжительное время в почве, на растительных остатках (Dillard, 1990; Dillard, Cobb, 1993) и в сорных растениях (Raid, Pennypacker, 1987). Работами ряда авторов (Read, Hide, 1988; Barkdoll, Davis, 1992; Johnson et al., 1997; Dillard, Cobb, 1993) показано, что развитие заболевания на картофеле и томате в значительной степени зависит от присутствия инокулюма в семенном материале и в почве. Поэтому для минимизации потерь от заболевания необходима диагностика (в том числе количественная) пропагул гриба в семенном материале, в почве, в закладываемых на хранение семенных клубнях картофеля и семенах томата. Морфологическая диагностика в почве и растительном материале может проводиться только по присутствию микросклероциев, которые, однако, встречаются и у других видов грибов. Симптомы на клубнях очень похожи на серебристую паршу, вызываемую грибом *Helminthosporium solani*. Выделение *Colletotrichum coccodes* и *Helminthosporium solani* в чистую культуру довольно

сложно и занимает продолжительное время в связи с медленным ростом на питательной среде. Для быстрого выявления *Colletotrichum coccodes* необходимо использование инструментальных методов диагностики. Наиболее удобным методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификация — ПЦР в реальном времени. В настоящее время в странах Европы и США используется тест-система, разработанная английскими исследователями (Cullen et al., 2002) к ITS1 участку рДНК. Ее использование показало хорошие результаты и при анализе российских изолятов (Belov et al, 2018). Однако *C. coccodes* обладает высокой изменчивостью и его выявление по одной последовательности ДНК может привести к ложноотрицательным результатам. Для большей достоверности диагностики необходим анализ по нескольким видоспецифичным последовательностям ДНК, в связи с чем нами была разработана оригинальная тест-система, позволяющая идентифицировать *C. coccodes* по последовательности гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки эффективности и специфичности созданных тест-систем были использованы чистые культуры 15 видов грибов, выделенных авторами из пораженных образцов листьев и плодов томата, клубней картофеля (табл. 1). Для выделения брали органы растений с симптомами грибного поражения, не более одного органа с куста. Срез клубня с кожурой, ломтик плода томата, пораженный лист помещали под бинокулярный микроскоп, после чего остро заточенной препаровальной иглой мицелий, споры или кусочек ткани переносили на агаризованную среду (сусло-агар) в чашке Петри. Хранили изоляты на скошенной агаризованной среде в пробирках при 4°C.

Предназначенные для анализа образцы листьев томата с симптомами поражения грибными болезнями сразу после сбора (на поле) помещали в 70%-й этиловый спирт в котором и хранили до выделения ДНК. Клубни картофеля доставляли в лабораторию, с них снимали кожуру (кусочек 2 × 1 см) и замораживали на –20°C. В замороженном состоянии хранили до выделения ДНК.

Чистые культуры грибов для выделения ДНК выращивали в жидкой гороховой среде. Мицелий гриба извлекали из жидкой среды, подсушивали на фильтровальной бумаге, замораживали в жидком азоте, гомогенизировали, инкубировали в СТАВ-буфере, очищали хлороформом, осаждали смесью изопропанола и 0.5M ацетата калия, 2 раза промывали 70%-м спиртом. Полученную ДНК растворяли в деионизированной воде и хранили при –20°C (Kutuzova et al., 2017). Концентрацию ДНК измеряли с использованием набора HS DNA quantification kit для двухцепочечной ДНК на

Таблица 1. Происхождение использованных в работе штаммов грибов

Название гриба	Растение, орган	Место выделения
<i>Colletotrichum coccodes</i> 1, <i>C. coccodes</i> 2, <i>C. coccodes</i> 3, <i>Ilyonectria crassa</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	клубень картофеля	Костромская обл., клубни картофеля 1-го полевого поколения, сорт Ред Скарлетт
<i>Colletotrichum coccodes</i> 4 <i>Helminthosporium solani</i>	лист картофеля клубень картофеля	Респ. Марий Эл, г. Йошкар-Ола Магаданская обл., пос. Палатка, клубень картофеля
<i>Cladosporium fulvum</i> <i>Alternaria tomatophila</i>	лист томата плод томата	Московская обл., крупноплодный томат передан сотрудниками лаборатории мико- логии и фитопатологии ВНИИ защиты растений
<i>Fusarium verticillium</i> , <i>Phomopsis phaseoli</i> , <i>Alternaria</i> <i>alternata</i> , <i>Phellinus ferrugineovelutinus</i> , <i>Stem-</i> <i>phylium vesicarium</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Acrodontium luzulae</i> , <i>Penicillium</i> sp.	плод томата	Краснодарский край, Крымский р-н, сорт Сливка
<i>Fusarium oxysporum</i>	корень пшеницы	Московская обл.

Qubit 3.0 (Qiagen, Германия). Заспиртованные и замороженные образцы растирали в жидком азоте, далее проводили выделение ДНК аналогично описанному выше (для мицелия чистых культур грибов).

ПЦР проводили на амплификаторе DTprime (ДНК-Технология). Для проведения ПЦР использовали оригинальные праймеры и зонд на видоспецифичный участок гена глицеролтрифосфатдегидрогеназы: прямой праймер Soc70gdf – TCATGATATCATTTCTCTCACGGCA, обратный праймер Soc280gdr – TACTTGAGCATGTAGG-CCTGGGA, зонд Socgdz – (BHQ1)-AGTGT-GCTTGAGA-(FAMdT)-GGGCTGCTGCCG(p). Праймеры амплифицируют участок размером 213 пн.

В реакцию брали 50 нг тотальной ДНК (при анализе листьев и клубней) и 10 нг (при анализе ДНК чистых культур грибов). Реакционная смесь (35 мкл) разделялась парафиновой прослойкой на две части: нижняя (20 мкл) содержала 2 мкл 10× реакционного буфера (750 mM Tris-HCl, pH 8.8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 25 mM MgCl₂; 0.1% Tween-20), 0.5 mM каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 7 пмоль каждого праймера и 4 пмоль гидролизуемого флуоресцентного зонда; верхняя содержала 1 мкл 10× буфера для ПЦР и 1 ед Taq-полимеразы. Разделение смеси парафином позволяет длительно хранить пробирки при температуре 5°C и обеспечить горячий старт ПЦР после их прогрева в течение 10 мин при температуре выше 80°C. ПЦР проводили по следующей программе: 94.0°C – 90 с (1 цикл); 94.0°C – 30 с; 64.0°C – 15 с (5 циклов); 94.0°C – 10 с; 64.0°C – 15 с (45 циклов); 10.0°C – хранение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательности гена глицеролтрифосфатдегидрогеназы были определены у 45 штаммов, выделенных из листьев, стеблей, клубней картофеля и плодов томата (Kutuzova, 2018) в разных регионах России. Исследованные последовательности всех штаммов разделились на 2 группы, различающиеся двумя нуклеотидами. В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности представителей обеих групп за номерами KY496634 и KY496635.

Сконструированные на их основе праймеры soc70gdf, soc280gdr и зонд socgdz проверяли с помощью программы BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) на всех имеющихся в базе GenBank последовательностях гена глицеролтрифосфатдегидрогеназы видов рода *Colletotrichum* и других организмов. Участков ДНК других организмов, высоко гомологичных праймерам и зонду, обнаружено не было.

Чувствительность тест-системы проверяли с использованием проб с разными концентрациями ДНК *C. coccodes*, ДНК пораженного антракнозом листа картофеля (собиран в 2017 г. в Марий Эл, сорт Ред Скарлет), и кожуры клубней, пораженных черной пятнистостью (собираны в Костромской обл., сорт Ред Скарлет, табл. 2). Для подтверждения присутствия ДНК в клубнях и в листе картофеля из них были выделены в чистые культуры штаммы *C. coccodes*.

Результаты анализа чувствительности тест-системы показывают, что с ее помощью можно успешно диагностировать наличие в образце ДНК *C. coccodes* при ее суммарном содержании в ПЦР-смеси более 0.05 нг. Этого вполне достаточно для детекции, поскольку в одном склеротии содержится в среднем 0.131 нг, а в одной споре – около

Таблица 2. Определение чувствительности предложенной тест-системы идентификации *Colletotrichum coccodes* для ПЦР в реальном времени

Образец	Количество ДНК в пробе*, нг	Пороговый цикл	Детекция <i>C. coccodes</i>
Мицелий <i>Colletotrichum coccodes</i>	50	21.3	+
	5	25.7	+
	0.5	29.7	+
	0.05	33.5	+
	0.005	40	—
	0.0005	42.8	—
	0.00005		—
Кожура клубня 1	50	32	+
Кожура клубня 2	50	30	+
Кожура клубня 3	50	31.5	+
Лист картофеля	50	29.5	+

Примечание. *В смеси продуктов ПЦР.

0.04 нг ДНК (Cullen et al., 2002). Тест-система, разработанная английской группой (Cullen et al., 2002), показала сходную, чувствительность (пороговый цикл 34 при 0.05 нг ДНК и 37 при 0.005 нг). Анализ природных образцов, содержащих *C. coccodes* во всех случаях позволил достоверно выявить его присутствие в пробе (табл. 2). Предложенный метод выделения ДНК также оказался

применим для анализа природных растительных образцов.

Проверка специфичности тест-системы проводилась на образцах ДНК, экстрагированной из 15 видов грибов. Все штаммы грибов были выделены авторами из пораженных и здоровых плодов и листьев томата, клубней картофеля; один штамм был выделен из корня пшеницы (табл. 1). Среди выделенных с поверхности плода есть и непатогенные для томата виды (например, *Phellinus ferrugineovelutinus*). Исследования показали, что ДНК *C. coccodes* выявлялась при пороговом цикле 20–27, тогда как остальные виды грибов не детектировались или давали сигнал после 40 цикла, что можно отнести к неспецифическому шумовому эффекту (табл. 3).

Разработанная тест-система была использована для идентификации *C. coccodes* в образцах листьев томата с симптомами поражения некротрофными патогенами и клубней семенного картофеля без видимых симптомов. Для исследования были взяты семенные клубни разных сортов, выращенных в Костромской, Московской, Калужской, Нижегородской областях. Достоверным присутствием ДНК *C. coccodes* считали в образцах, при анализе которых пороговый цикл не превышал значения 35. Это пороговое значение было выбрано исходя из достоверного определения 0.05 нг ДНК *C. coccodes* (пороговый цикл 33.5, табл. 2) и того факта, что при пороговых циклах выше 40 диагностировалась неспецифическая ДНК некоторых других видов грибов. При таком подходе достоверное присутствие ДНК *C. coccodes* было выявлено в 5 образцах клубней, выращенных в Костромской, Московской, Калужской областях и в одном листе томата из Ейского р-на Краснодарского края (табл. 4, 5).

Таблица 3. Проверка тест-системы на грибах различных видов

Название гриба	Пороговый цикл
<i>Colletotrichum coccodes</i> 1	20.9
<i>C. coccodes</i> 2	22.6
<i>C. coccodes</i> 3	23
<i>C. coccodes</i> 4	22
<i>Fusarium oxysporum</i>	>40
<i>F. verticillium</i>	>40
<i>Rhizoctonia solani</i>	>40
<i>Phomopsis phaseoli</i>	>40
<i>Alternaria alternata</i>	>40
<i>A. tomatophila</i>	>40
<i>Helminthosporium solani</i>	>40
<i>Phellinus ferrugineovelutinus</i>	>40
<i>Stemphylium vesicarium</i>	>40
<i>Ilyonectria crassa</i>	>40
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	>40
<i>C. fulvum</i>	>40
<i>Acrodontium luzulae</i>	>40
<i>Penicillium</i> sp.	>40

Примечание. *Количество ДНК во всех пробах было 10 нг.

Таблица 4. Детекция *Colletotrichum coccodes* на клубнях картофеля*

Номер образца	Сорт картофеля	Место произрастания	Детекция <i>C. coccodes</i>	Пороговый цикл
1	Рэд Скарлет	Костромская обл.	+	35
2			+	35
3			—	38
4			+	34
5			—	
6			—	41
7			—	41.8
8	Сантэ	Московская обл.	+	30
9			—	40.5
10			—	40.6
11			—	
12	Жуковский ранний	Московская обл.	—	
13			—	
14	Молли	Калужская обл.	+	34.3
15	Фантазия	Калужская обл.	—	38.4
16			—	

Примечание. *Количество ДНК во всех пробах было 50 нг.

Таблица 5. Детекция *Colletotrichum coccodes* на листьях томата*

Номер образца	Место произрастания	Детекция <i>C. coccodes</i>	Пороговый цикл
1	Краснодарский край, Крымский р-н	—	
2		—	
3		—	
4		—	45
5		—	
6		—	
7		—	
8		—	
9	Краснодарский край, Ейский р-н	—	39.2
10		—	40.8
11		—	
12		—	41.6
13		—	40
14		—	41
15		—	41.9
16		—	
17		—	
18		—	40.3
19		—	
20		—	
21		+	34.5
22		—	
23		—	

*Количество ДНК во всех пробах было 50 нг.

Созданная нами тест-система не уступает разработанной английскими исследователями (Cullen et al., 2002) по чувствительности и специфичности и подходит для анализа растительных образцов. Ее применение для анализа семенных клубней позволило выявить ДНК *C. coccodes* у клубней без внешних признаков поражения и успешно провести анализ зараженности листьев. В России до настоящего времени не проводили анализа клубней картофеля на пораженность *C. coccodes*. Наше впервые проведенное исследование показало, что из 16 протестированных семенных клубней, выращенных в разных регионах РФ, 5 содержат *C. coccodes*. Это показывает, что черная пятнистость клубней картофеля – обычное заболевание картофеля в России, и его роль в снижении объема и качества урожая картофеля недооценена.

При анализе листьев томата достоверное присутствие ДНК *C. coccodes* выявлено в одном листе из Ейского р-на Краснодарского края. Ранее при обследовании полей томата на юге России с помощью британской тест-системы (Cullen et al., 2002) были выявлены листья, содержащие *C. coccodes*, причем на некоторых полях обнаружена высокая доля листьев, пораженных *C. coccodes* (Belov et al., 2018). В Краснодарском и Приморском краях, Московской области нами были обнаружены плоды томата, из которых удалось выделить чистые культуры *C. coccodes*. Возможно, на томате в России *C. coccodes* распространен значительно шире, чем считается сейчас, и его вредоносность также недооценена.

Таким образом, к настоящему времени накопилось достаточно информации о широком распространении *C. coccodes* на картофеле и томате. Для лучшего понимания роли этого гриба в развитии болезней картофеля и томата необходим широкий мониторинг распространенности его в России, изучение роли почвенной и семенной инфекции, роли черной пятнистости в потерях при хранении. Применение ПЦР-диагностики может существенно облегчить проведение этой работы, а одновременное применение обеих тест-систем позволит существенно увеличить точность анализа.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-76-00009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andrion D., Lucas J.-M., Guérin C., Jouan B. Colonization of roots, stolons, tubers and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black-dot fungus *Colletotrichum coccodes*. Plant Pathol. 1998. V. 47. P. 440–445.
- Barkdoll A.W., Davis J.R. Distribution of *Colletotrichum coccodes* in Idaho and variation in pathogenicity on potato. Plant Disease. 1992. V. 76. P. 131–135.
- Belov G.L., Belosokhov A.F., Kutuzova I.A., Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Yu., Elansky S.N. *Colletotrichum coccodes* in potato and tomato leaves in Russia. J. Plant Dis. Prot. 2018. V. 125. P. 311–317.
- Ben-Daniel B., Bar-Zvi D., Tsrer (Lahkim) L. Transmission of *Colletotrichum coccodes* via tomato seeds. Phytoparasitica. 2010. V. 38 (2). P. 167–174.
- Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K., Duncan J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. Plant Pathol. 2002. V. 51. 281–292.
- Dillard H.R. Survival of *Colletotrichum coccodes* in New York. Phytopathology. 1990. V. 80. P. 1026.
- Dillard H.R. The pathogen and its hosts. In: J.A. Bailey, M.J. Jeger (eds). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford, 1992, pp. 225–236.
- Dillard H.R., Cobb A.C. Persistence of *Colletotrichum coccodes* on tomato roots and in soil. Phytopathology. 1993. V. 83. P. 1345.
- Hunger R.M., McIntyre G.A. Occurrence, development, and losses associated with silver scurf and black dot on Colorado potatoes. Amer. Potato J. 1979. V. 56. P. 289–306.
- Johnson D.A. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. Plant Disease. 1994. V. 78. P. 1075–1078.
- Johnson D.A., Rowe R.C., Cummings T.F. Incidence of *Colletotrichum coccodes* in certified potato seed tubers planted in Washington state. Plant Disease. 1997. V. 81. P. 1199–1202.
- Kutuzova I.A. Intraspecific variability of plant pathogenic fungus *Colletotrichum coccodes* and *Helminthosporium solani*. PhD thesis. Moscow, 2018 (in Russ.).
- Kutuzova I.A., Kokaeva L.Yu., Pobedinskaya M.A., Krut'kov Yu.A., Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment. J. Plant Pathol. 2017. V. 99 (3). P. 635–642.
- Lees A.K., Hilton A.J. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. Plant Pathol. 2003. V. 52. P. 3–12.
- Raid R.N., Pennypacker S.P. Weeds as hosts for *Colletotrichum coccodes*. Plant Disease. 1987. V. 71. P. 643–646.
- Read P.J., Hide G.A. Effects of fungicides on the growth and conidial germination of *Colletotrichum coccodes* and on the development of black dot disease of potatoes. Annls Appl. Biol. 1995. V. 126. P. 437–447.
- Read P.J., Hide G.A. Effects of inoculum source and irrigation on black dot disease of potatoes [*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes] and its development during storage. Potato Res. 1988. V. 31. 493–500.
- Tsrer (Lahkim) L., Erlich O., Hazanovsky M. Effect of *Colletotrichum coccodes* on potato yield, tuber quality, and stem colonization during spring and autumn. Plant Disease. 1999. V. 83. P. 561–565.
- Кутузова И.А. (Kutuzova) Внутривидовая вариабельность фитопатогенных грибов *Colletotrichum coccodes* и *Helminthosporium solani*. Дисс. ... канд. биол. наук. М., 2018. 140 с.

Detection of *Colletotrichum coccodes* by Real-Time PCR

D. Yu. Ryazantsev^a, E. M. Chudinova^b, L. Yu. Kokaeva^{c,d}, S. N. Elansky^{b,c,#},
P. N. Balabko^c, G. L. Belov^d, and S. K. Zavriev^a

^a Shemyakin – Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, 117997 Moscow, Russia

^b Peoples Friendship University of Russia, 117198 Moscow, Russia

^c Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

^d All-Russian Lorh Research Institute of Potato Farming, 140052 Moscow, Russia

[#]e-mail: snelansky@gmail.com

Colletotrichum coccodes causes dangerous diseases of potato and tomato, known as Anthracnose and Black Spot. Morphologically, they are often difficult to distinguish from diseases caused by other microorganisms. On the green tomato fruits disease may be asymptomatic. It appears only on ripe red fruits. For quick and accurate diagnosis and identification of the pathogen a test system for real-time PCR is proposed. To develop a test system the nucleotide sequence of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene was determined in 4 different strains of *C. coccodes*. Based on the results obtained and the analysis of similar sequences of other species available in the GenBank Database, the *C. coccodes* species-specific primers and probe were designed. To test the specificity of the created test system, PCR was performed with DNA isolated from pure cultures of 15 different types of parasitic and saprotrophic fungi associated with tomato and potato plants (*Fusarium oxysporum*, *F. verticillium*, *Phomopsis phaseoli*, *Alternaria alternata*, *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Phellinus ferrugineovelutinus*, *Stemphylium vesicarium*, *Helminthosporium solani*, *Phomopsis phaseoli*, *Neonectria radicola*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* sp., *Cladosporium fulvum*, *C. cladosporioides*). The presence of *Colletotrichum coccodes* DNA was determined at a 20–27 threshold cycle. The remaining types of fungi were determined after 40 cycles or were not detected at all. The test system allows confidently detect in the analyzed PCR-mixture concentrations of *C. coccodes* exceeding 0.01 ng/mm³. Using the test system created was investigated the presence of *C. coccodes* in tomato leaves with symptoms of fungal diseases and potato tubers without external symptoms of the disease. Leaves with fungal lesion symptoms were collected from 2 different fields in the Krasnodar region, tubers – from the fields in the Kostroma, Moscow, Kaluga, Nizhny Novgorod regions. A single leaf of tomato containing *C. coccodes* DNA was found while the presence of *C. coccodes* DNA tubers grown in the Kostroma, Moscow and Kaluga regions was detected in 5 samples.

Keywords: glycerol triphosphate dehydrogenase gene, PCR, phytopathogenic fungi, species-specific primers, test system