

Мониторинг вирусных инфекций картофеля с использованием матричной ПЦР-диагностики

А.М. Малько, А.В. Живых, М.М. Никитин, П.А. Французов, Н.В. Стацок, В.Г. Джавахия, А.Г. Голиков

Наиболее эффективным способом контроля распространения вирусов картофеля остается использование безвирусного семенного материала, что требует применения точных и надежных способов выявления и идентификации широкого спектра вирусов. Один из перспективных методов, обеспечивающих возможность проверки образцов сразу на целый ряд патогенных инфекций, – ПЦР-диагностика в реальном времени на базе одноразовых ПЦР-матриц. В статье приведены результаты массового скрининга посадок картофеля в 11 регионах России при помощи ПЦР-матриц для одновременной диагностики 8 вирусных и виroidных патогенов картофеля – PVY (в т.ч. ординарной (PVY^o) и некротической (PVY^{NTN}) форм), PVX, PVM, PVS, PVA, PLRV, PMTV, PSTVd – в режиме реального времени. В результате анализа 593 образцов максимальное разнообразие вирусных инфекций было выявлено в Нижегородской и Ленинградской областях, минимальное – в Краснодарском и Ставропольском краях и Калининградской области. Максимальная географическая распространенность была отмечена для PVY^o (9 регионов), PVM (9 регионов) и PVS (8 регионов). Высокая встречаемость PVYO была выявлена в Самарской, Тверской и Ленинградской областях (33,3%, 29,2% и 25,7% от общего числа проанализированных образцов), PVS – в Самарской и Иркутской областях (66,7% и 30,5% соответственно), PVM – в Тверской, Самарской и Нижегородской областях (25,0%, 22,2% и 19,4% соответственно). Для остальных регионов (а также для прочих вирусов и виroidов) аналогичные показатели в основном не превышали 15%. Максимальное количество образцов со смешанной вирусной инфекцией было обнаружено в Нижегородской (19) и Ленинградской (14) областях. Превышение числа инфицированных образцов над числом здоровых было выявлено для Самарской, Тверской, Ленинградской, Нижегородской и Иркутской областей. Впервые с использованием унифицированной методики и стандартизованных ПЦР-матриц получена детальная информация о присутствии ряда вирусных инфекций на территории изученных регионов и продемонстрированы возможности и преимущества данной технологии для мониторинга вирусных болезней картофеля.

Ключевые слова: вирусы картофеля, ПЦР в реальном времени, диагностика, ПЦР-матрицы, мониторинг.

Картофель – одна из основных с.-х. культур России. Занимая третье место в мире по объему производства картофеля (31–34 млн т в год), наша страна, в то же время, характеризуется довольно невысокой средней его урожайностью – 14–15 т/га [1]. Различия между потенциальной урожайностью сорта, достигающей для некоторых сортов уровня 65–75 и даже 100–120 т/га, и реальной его продуктивностью, в значительной степени связаны с потерями урожая, вызванными различными болезнями картофеля [2]. В целом общемировые потери урожая картофеля, связанные с различными болезнями и вредите-

лями, достигают 40%, из них около 7% связаны с вирусными болезнями [3].

Сегодня в мире идентифицировано около 40 патогенных вирусов, способных поражать картофель [4]. Наиболее распространенные и экономически значимые вирусы картофеля: Y (PVY), X (PVX), S (PVS), M (PVM) и вирус скручивания листьев картофеля (PLRV); менее патогенные – вирус картофеля A (PVA), вирус метельчатости верхушки картофеля (PMTV), ряд других вирусов, а также виroid веретеновидности клубней (PSTVd). Каждый из этих патогенов способен привести к потере от 10 до 60% урожая, а при смешанной вирусной инфекции потери могут быть еще

выше [5]. Со временем накопление инфекции и передача ее потомству через клубни приводит к вырождению сорта и падению его урожайности на 30–80% [6]. Основные способы защиты картофеля от вирусных болезней: выбраковка инфицированных семенных клубней, оздоровление семенного материала, уничтожение переносчиков (тли, нематоды, грибы), а также минимизация вероятности перезаражения. В первых двух вариантах важное значение имеет высокоточная диагностика, позволяющая выявить присутствие вирусов даже при низкой инфекционной нагрузке.

До недавнего времени точность диагностики вирусных инфекций была недостаточно высокой, поскольку основывалась на визуальных симптомах поражения. В настоящее время появились достаточно надежные тест-наборы, основанные на использовании методов иммуноферментного анализа (ИФА) или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако в большинстве случаев они основаны на принципе «один тест – один патоген», что не всегда удобно для полевой диагностики, особенно в случае смешанной инфекции.

Один из современных перспективных методов, обеспечивающих возможность проверки образцов сразу на целый спектр патогенных инфекций – ПЦР-диагностика в реальном времени на базе одноразовых ПЦР-матриц, содержащих иммобилизованные лиофилизированные тест-системы. Специальная технология изготовления матриц обеспечивает возможность их длительного (3–6 месяцев) хранения при комнатной температуре и существенно упрощает и ускоряет процесс анализа. Исследования проводили на серийно выпускаемом микрочиповом амплификаторе AgiDNA (ООО «Люмэкс-Маркетинг», Россия). Тест-системы для диагностики вирусных и бактериальных инфекций картофеля, а также фитофтороза были разработаны ООО «ГенБит». Предел обнаружения для этих тест-систем составил 1 нг/мл, что позволяет получать

Количество образцов картофеля с вирусными инфекциями, выявленными с использованием диагностических ПЦР-матриц «Патогены картофеля. РНК» и «Патогены картофеля. РВУ» в 2015–2017 годах

Регион	Калининградская обл.	Костромская обл.	Московская обл.	Ленинградская обл.	Тверская обл.	Нижегородская обл.	Самарская обл.	Республика Татарстан	Краснодарский край	Ставропольский край	Иркутская обл.
Общее количество анализов	32	118	17	109	24	98	9	55	19	7	105
PVY ^o	1	4	1	28	7	15	3	7			9
PVY ^{NTN}				13			1	2	1		2
PLRV						2					
PVX				4		11					
PVS		14	1	3	4	4	6	5			32
PVM		1	1	9	6	19	2	1		1	12
PVA						9					
PMTV		7		1							
PVY ^{общ}				16							
PSTVd						4					1
Смешанные инфекции		1	1	14	6	19	3	3			2
Доля инфицированных образцов, %	3,1	22,0	17,7	67,9	70,8	65,3	88,9	27,3	5,3	14,3	53,3

результаты даже в случае скрытой инфекции. Проведенные в 2015 году первые испытания тест-систем в полевых условиях показали более высокую их чувствительность по сравнению с им-

мунохроматографическим анализом на тест-полосках [7]. В настоящей статье приведены данные широкомасштабных испытаний разработанных диагностических систем для выявле-

ния 8 вирусов и вириодов картофеля в различных регионах России.

Условия, материалы и методы. Исследования были выполнены в 2015–2017 годах на базе филиалов ФГБУ «Россельхозцентр» по Ленинградской, Московской, Костромской, Нижегородской, Тверской, Иркутской, Самарской, Калининградской областям, Ставропольскому и Краснодарскому краям и Республике Татарстан. Сбор образцов в вышеперечисленных 11 регионах проводили специалисты ФГБУ «Россельхозцентр» в соответствии с существующими рекомендациями [8]. Анализ образцов проводили в соответствующих филиалах ФГБУ «Россельхозцентр» за исключением образцов из Краснодарского края, исследованных в лаборатории филиала по Московской области.

Выделение вирусной РНК из собранных листьев картофеля проводили с использованием набора «Рибо-сорб» производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ РНК выполняли на микропипетом амплификаторе AriaDNA

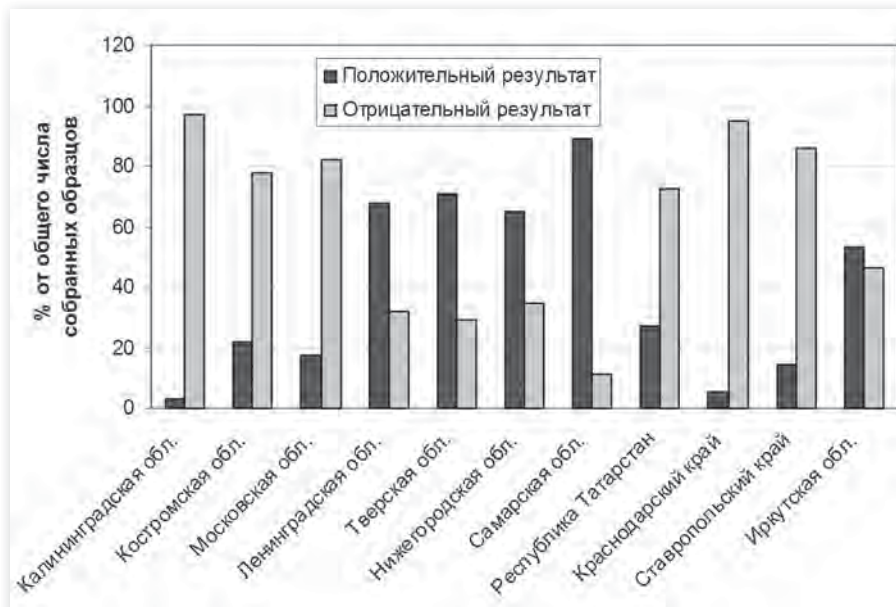


Рис. 1. Результаты диагностики вирусных и вириодных болезней картофеля в различных регионах России

с использованием ПЦР-матриц «Патогены картофеля. РНК», укомплектованных тест-системами для выявления PVY (ординарной (PVY^O) и некротической (PVY^{NTN}) форм), PVX, PVM, PVS, PVA, PLRV, PMTV, PSTVd. Кроме того, в Ленинградской области в 2017 году дополнительно были проведены испытания матриц с тест-системой для выявления всех форм

PVY (разработаны для количественного определения зараженности партии картофеля).

Результаты и обсуждение.

Результаты проведенного анализа представлены в **таблице**. Согласно полученным данным, максимальное разнообразие вирусных патогенов было выявлено в Нижегородской (6 вирусов и 1 вириод) и Ленинградской

(6 вирусов, включая две формы PVY) областях, минимальное (по одному вирусу) – в Краснодарском и Ставропольском краях, а также в Калининградской области. Максимально широкая географическая распространенность была отмечена для ординарной формы PVY (9 регионов), PVM (9 регионов) и PVS (8 регионов), в то время как PLRV и PVA были обнаружены лишь в одном регионе каждый. Максимальное количество образцов со смешанной вирусной инфекцией было обнаружено в Нижегородской (19) и Ленинградской (14) областях.

Превышение числа инфицированных образцов над числом здоровых было выявлено для Самарской, Тверской, Ленинградской, Нижегородской и Иркутской областей (**рис. 1**). Минимальная доля инфицированных образцов была выявлена для Калининградской области и Краснодарского края (3,1 и 5% соответственно).

Максимальная частота встречаемости в регионах была отмечена для трех вирусов – PVY^O, PVM и PVS (**рис. 2**). Наиболее высокий уровень инфицирования картофеля PVY^O был выявлен в Самарской, Тверской и Ленинградской областях (33,3%, 29,2% и 25,7% от общего числа проанализированных образцов, соответственно). PVS был широко представлен в Самарской и Иркутской областях (66,7% и 30,5% от общего числа образцов, соответственно), а PVM – в Тверской, Самарской и Нижегородской областях (25,0%, 22,2% и 19,4% соответственно). Для остальных регионов (а также для прочих вирусов и вириодов) аналогичные показатели в основном не превышали 5–15%. Смешанные вирусные инфекции составили заметную долю образцов, собранных в Самарской, Тверской и Нижегородской областях (33,3%, 25,0% и 19,4% от общего количества образцов соответственно).

Выводы. Проведенные испытания продемонстрировали возможности и преимущества разработанных диагностических ПЦР-матриц для мониторинга вирусных заболеваний картофеля в России. Полученные в результате исследования результаты обеспечивают возможность сравнения изученных регионов по уровню представленности вирусных инфекций картофеля и степени пораженности картофеля и позволяют сделать выводы о географической распространенности различных вирусов и вириодов картофеля, а также присутствии смешан-

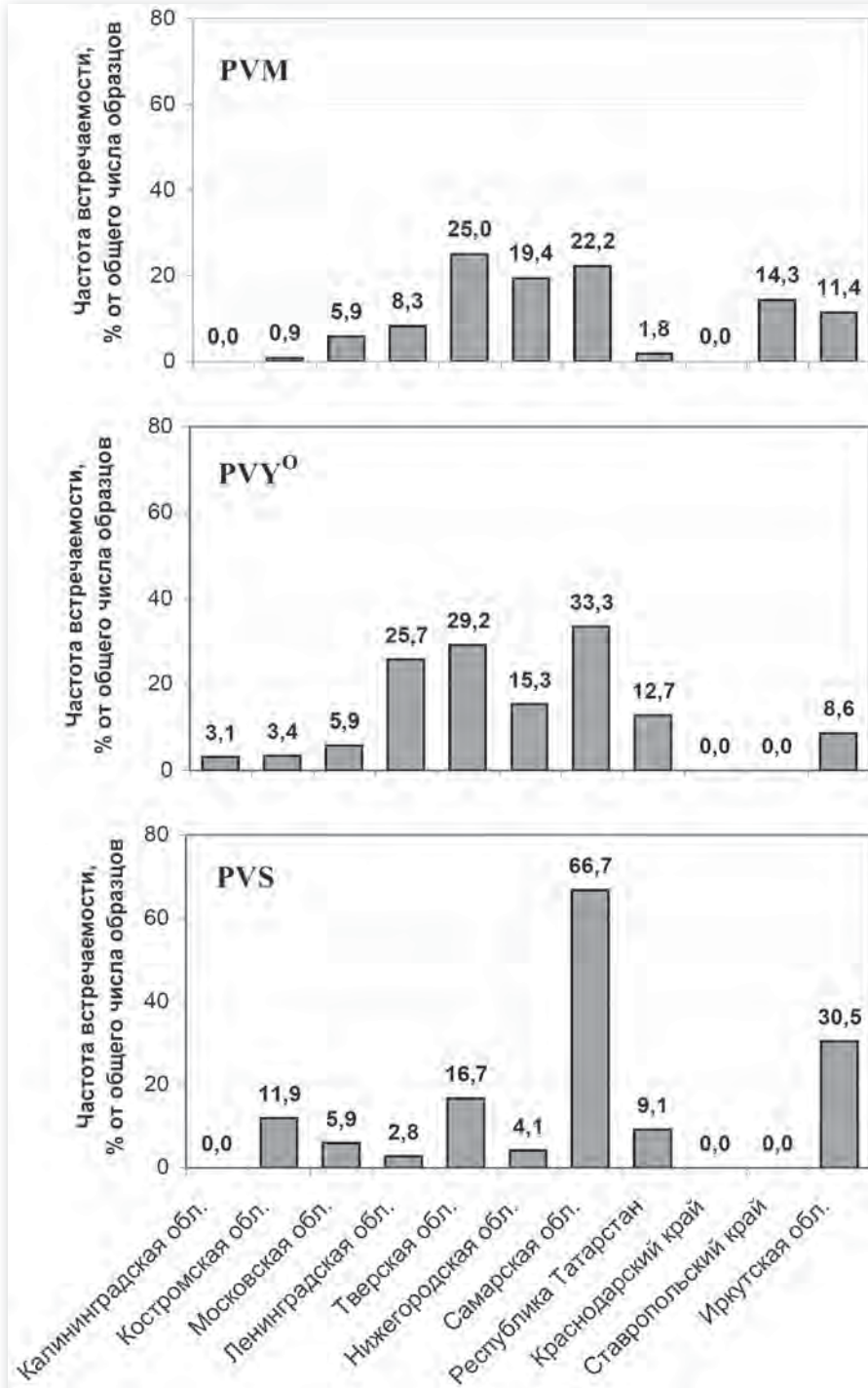


Рис. 2. Частота встречаемости наиболее распространенных вирусов картофеля в исследованных регионах России

ных вирусных инфекций. Они будут использованы для приведения сертификации семян в Российской Федерации в соответствие с международными требованиями в целях выхода на зарубежные рынки [9].

Благодарности

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16–16–04109; разработка и валидация тест-систем, лабораторное тестирование диагностической ПЦР-матрицы для выявления вирусов и виридов картофеля).

Библиографический список

- Суринов А. Е. и др. Российский статистический ежегодник. М.: Росстат, 2015. 725 с.
- Ториков В. Е., Богомаз О. А. Адаптивный и продуктивный потенциал сортов картофеля нового поколения // Вестник Брянской государственн. с.–х. Академии. 2008. № 4. С. 53–59.
- Oerke E.–C. Crop losses to pests // J. Agr. Sci. 2006. V. 144. Pp. 31–43.
- Малько А. М. и др. Технологический процесс производства оригинального, элитного и репродукционного семенного картофеля. М.: ООО «Мирос», 2011. 32 с.
- Павлова Е. А. Диагностика скрытой вирусной инфекции картофеля – важный этап семеноводства // Защита и карантин растений. 2014. № 2. С. 15–16.
- Замалиева Ф. Ф. Борьба с вирусными болезнями картофеля // Защита и карантин растений. 2013. № 3. С. 17–21.
- Говоров Г. Н. и др. Мониторинг бактериальных и вирусных болезней сельскохозяйственных культур / Д. Н. Говоров, А. В. Живых, Е. С. Новоселов, А. Г. Голиков // Защита и карантин растений. 2015. № 7. С. 35–37.
- Рекомендации по учету и выявлению вредителей и болезней сельскохозяйственных культур / Под ред. Ю. Б. Шуровенкова. Воронеж, ВНИИЗР, 1984. 274 с.
- Malko A.M. Certification of Seeds in Russia and Post-Soviet Countries / Seed Testing International, International Seed Testing Association News Bulletin. 2016. № 153. Pp. 12–16.

Об авторах

Малько Александр Михайлович, доктор с.–х. наук, директор ФГБУ «Россельхозцентр».

E-mail: alexmalko@mail.ru

Живых Андрей Владимирович, канд. с.–х. наук, начальник отдела услуг в области защиты растений ФГБУ «Россельхозцентр».

E-mail: rscmonitoring@mail.ru

Никитин Максим Михайлович, канд. биол. наук, группа молекулярной биологии ООО «ГенБит».

E-mail: nikitin@genbitgroup.com

Французов Павел Александрович, канд. биол. наук, группа биохимии ООО «ГенБит».

E-mail: frontsuzov@genbitgroup.com

Стацюк Наталия Владимировна, канд. биол. наук, с. н. с. отдела болезней картофеля и овощных культур, Всероссийский НИИ фитопатологии.

E-mail: nataafg@gmail.com

Джавахия Виталий Георгиевич, канд. биол. наук, в. н. с., зав. отделом молекулярной биологии,

Всероссийский НИИ фитопатологии.
E-mail: vitaly@vniif.ru

Голиков Александр Григорьевич, канд. хим. наук, зам. директора по науке, ООО «ГенБит».

E-mail: golikov@genbitgroup.com

Monitoring of potato viral diseases in different regions of Russia using real-time PCR matrix-based technology

A.M. Mal'ko, DSc, director of the Russian Agricultural Center (RAC).

E-mail: alexmalko@mail.ru

A.V. Zhivyh, PhD, head of the Department of Plant Protection, RAC.

E-mail: rscmonitoring@mail.ru

M.M. Nikitin, PhD, group of Molecular Biology, GenBit LLC.

Email: nikitin@genbitgroup.com

P.A. Frantsuzov, PhD, group of Biochemistry, GenBit LLC.

E-mail: frontsuzov@genbitgroup.com

N.V. Statsyuk, PhD, senior researcher, department of potato & vegetable diseases, All-Russian Research Institute of Phytopathology (ARRIP).

E-mail: nataafg@gmail.com

V.G. Dzhavakhiya, PhD, head of the department of molecular biology, ARRIIP.

E-mail: vitaly@vniif.ru

A.G. Golikov, PhD, science director, GenBit LLC. E-mail: golikov@genbitgroup.com

Summary. The most efficient way to control viral potato diseases is the use of disease-free seed material that requires accurate and reliable tools for detection and identification of potato viruses. Real-time PCR diagnostics using disposable PCR matrices represents a promising method to screen samples for a wide range of pathogens. A diagnostic system based on PCR micromatrices

intended for detection of eight viral/viroid potato diseases (PVY including ordinary (PVY^O) and necrotic (PVY^{NTN}) forms, PVX, PVM, PVS, PVA, PLRV, PMTV, and PSTVd) have been used to screen target pathogens among ~600 samples collected in 11 regions of Russia. The maximum diversity of viral infections was observed in Nizhny Novgorod, Irkutsk, and Leningrad regions, while samples from Krasnodar and Stavropol Territories and Kaliningrad region included only one pathogen species each. The maximum geographic occurrence was registered for PVY^O, PVM, and PVS (9, 9, and 8 regions, respectively). A high frequency of PVY^O was registered for Samara, Tver', and Leningrad regions (33.3%, 29.2%, and 25.7% of the total number of samples, respectively). PVS was the most frequent in the Samara (66.7%) and Irkutsk (30.5%) regions. PVM was the most frequent in Tver', Samara, and Nizny Novgorod regions (25.0%, 22.2% and 19.4% respectively). The frequency of these viruses in other regions, like the frequency of other viral pathogens, did not exceed 15%. The maximum number of samples with mixed viral infection was observed for Nizhny Novgorod and Leningrad regions (19 and 14 respectively). Infected samples dominated in Samara, Tver', Leningrad, Nizhny Novgorod, and Irkutsk regions. In this study, detailed information on the occurrence of a range of viral/viroid pathogens of potato on the territory of the investigated regions has been first obtained using standardized PCR matrices and unified technology. The advantages and possibilities of such technology for the monitoring of viral potato diseases have been demonstrated.

Keywords: potato viruses, real-time PCR, diagnostics, PCR matrix, monitoring.

Курс на профессионализм

Филиал ФГБУ «Россельхозцентр» по Ростовской области повышает уровень подготовки специалистов.

Сотрудник зерноградского межрайонного отдела филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Ростовской области вернулась из Московской области, где приняла участие в учебном семинаре «Нормативное регулирование и методы контроля качества семенного картофеля. Отбор проб, клубневой анализ, лабораторная диагностика». Главной целью сбора, организованного на базе Всероссийского НИИ картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха, стало повышение эффективности деятельности специалистов, занимающихся диагностикой заболеваний картофеля. В задачи семинара входило доведение и разъяснение современных методов лабораторной диагностики клубневых проб в системе сертификации семенного картофеля. В том числе правила отбора и подготовки проб для лабораторного тестирования.

Участники семинара посетили теоретические занятия, а затем применили полученные знания в ходе практических работ по проведению клубневых анализов семенных партий картофеля с использованием специальных приборов. Повышение квалификации в области сортового и семенного контроля сельскохозяйственных растений участникам подтвердили выданными на руки свидетельствами о прохождении курсов.

Источник: <https://rosselhoccenter.com>