

УДК 632.911.2

Выявление и идентификация возбудителя порошистой парши картофеля методом ПЦР в реальном времени

М.М. НИКИТИН, К.О. ДЕЙЧ,
Е.А. ПАВЛОВА, А.В. ИВАНОВ,
Н.В. СТАЦЮК, В.Г. ДЖАВАХИЯ,
А.Г. ГОЛИКОВ
e-mail: golikov@genbitgroup.com

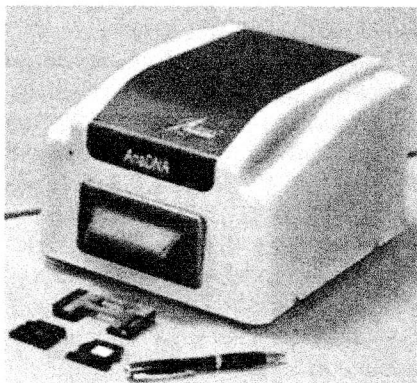
Порошистая парша картофеля, вызываемая плазмодиомицетом *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh., достаточно широко распространена в регионах с существенным количеством осадков и тяжелыми сырыми почвами. Экономические потери, вызываемые этой болезнью, в первую очередь обусловлены поражением клубней и соответствующим ухудшением их товарного вида и лежкости и могут достигать 30 % на момент сбора урожая и еще 15 % за период хранения. Кроме того, возбудитель порошистой парши является переносчиком опасного моп-топ вируса [1]. Выявление порошистой парши в семенном картофеле приводит к его отбраковке.

Споры патогена способны сохраняться в почве в течение многих лет, а высокоустойчивых к болезни сортов картофеля и препаратов, обеспечивающих достаточно высокую эффективность защиты, не существует [4, 7].

Благодаря развитию глобальной торговли продовольствием, включая картофель, темпы распространения патогена существенно возросли. Согласно некоторым данным, распространение порошистой парши в разных регионах мира может быть связано с активным экспортом семенного картофеля из стран Европы, в первую очередь, Нидерландов [5]. В этих обстоятельствах важное значение приобретает ранняя диагностика патогена

на как на полях, так и в партиях семенного картофеля.

В настоящее время детекция *S. subterranea* осуществляется либо путем визуального выявления симптомов поражения, либо с использованием методов иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени [2, 8, 9]. За рубежом выпускаются коммерческие наборы для выявления возбудителя порошистой парши, например, иммунодиагностические тесты «Agristrip» («Bioreba») или наборы для ПЦР производства компании «Genesig»®. В России диагностические тест-системы для этого патогена не разрабатываются и не производятся, его идентификация осуществляется только методами визуального осмотра или микроскопирования, не способными обеспечить высокую эффективность. Целью данного исследования была разработка диагностической тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления и классификации *S. subterranea* в пробах клубневых тканей



1. Микрочиповый амплификатор AgriaDNA® с двумя ПЦР-матрицами и картриджем-держателем

картофеля. Для анализа была использована нуклеотидная последовательность участка ITS1 (GenBank KU182475.1). Подбор праймеров и флуоресцентных зондов осуществляли при помощи программы Oligo 6.0 («Molecular Biology Insights Inc.», USA). Специфичность праймеров проверяли с использованием программы BLAST базы данных NCBI.

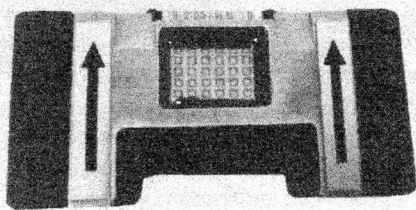
Поскольку *S. subterranea* является облигатным внутриклеточным паразитом, выделение и поддержание этого патогена в чистой культуре невозможно [6]. В связи с этим проверку эффективности разработанной тест-системы проводили с использованием клубней с подтвержденным поражением порошистой паршой, выявленных при проведении клубневого анализа партий семенного картофеля сортов Ред Скарлетт и Коломба, закупленных в 2017 г. в Финляндии и поступивших в филиал ФГБУ «Россельхозцентр» по Ленинградской области в рамках программы сертификации семенного картофеля. Подтверждение первичного диагноза, установленного по методике ГОСТ Р 55329–2012 (Картофель семенной). Приемка и методы анализа) осуществляли на базе филиала методом микроскопирования тонких срезов пораженной ткани клубней. Клубни картофеля, на поверхности и в тканях которых специалистами Россельхозцентра были обнаружены пустулы, заполненные порошокобразной бурой массой спорочуек патогена, были использованы для тестирования разработанных праймеров.

Выделение ДНК патогена из образцов, взятых из пустул на поверхности клубней, проводили с использованием набора «AmpliSens® DNA-sorb-B» производства ЦНИИ эпидемиологии (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Конечную концентрацию ДНК в пробах определяли спектрофотометрическим методом на 260 нм при помощи спектрофото-

метра SmartSpec Plus («BioRad», США).

Оптимизацию условий амплификации, а также проверку чувствительности и селективности разработанной тест-системы проводили в матричном формате в режиме реального времени на микрочиповом амплификаторе AriaDNA® («Люмэкс», Россия; рис. 1) с использованием одноразовых 30-луночных микроматриц, содержащих иммобилизованные и лиофилизированные компоненты тест-системы (рис. 2).

Оптимальные условия проведения ПЦР подбирали путем изменения состава амплификационной смеси, а также температуры отжига праймеров. Объемы компонентов, входящих в реакционную смесь, варьировали в диапазонах:



Ss	IC	Ss	IC	Ss	IC
Ss	IC	Ss	IC	Ss	IC
Ss	IC	Ss	IC	Ss	IC
Ss	IC	Ss	IC	K ^{+Ss}	K ^{-IC}
Ss	IC	Ss	IC	K ^{+Ss}	K ^{+IC}

2. Стандартная 30-луночная микроматрица для диагностики *Spongospora subterranea*. Вверху: общий вид микроматрицы в картридже. Внизу: топологическая схема микроматрицы для одновременного анализа 13 образцов. Ss – *S. subterranea*, IC – внутренний контроль, K^{+Ss} и K^{-Ss} – положительный и отрицательный контроли для *S. subterranea*, K^{+IC} и K^{-IC} – положительный и отрицательный контроли для внутреннего контроля

Влияние температуры отжига праймеров на пороговый цикл и уровень флуоресценции разработанной тест-системы для выявления и идентификации *Spongospora subterranea*

Температура отжига (°C)	Пороговый цикл Ct	Максимум флуоресценции
56	18,59	1900
60	18,30	7600
62	22,28	720

смесь дНТФ – от 0,4 до 0,8 мкл; смесь праймеров и зонда («Биотех-Индустрия», Россия) – от 1 до 2,5 мкл;

Taq-полимераза («СибЭнзим», Россия) – от 0,5 до 1,5 мкл.

Чувствительность тест-системы оценивали путем анализа серии последовательных разведений образца ДНК патогена в диапазоне от 0,02 нг/мл до 20 мкг/мл, а видоспецифичность тест-системы – путем анализа образцов ДНК *S. subterranea* и смеси ДНК других патогенов картофеля – *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Rizoctonia solani* и *Phytophthora infestans* (концентрация ДНК каждого патогена составляла 1 мкл/мл). Вышеперечисленные образцы патогенов были получены из государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов Всероссийского НИИ фитопатологии.

В результате анализа нуклеотидной последовательности ITS региона ДНК *S. subterranea* были подобраны прямой (GCCTCTTTGAGTGTCGGTT) и обратный (AATCAGAAGCCAGAGACGC) праймеры и флуоресцентный зонд (FAM-TGTGCGTGGAAGGGGACTA-BHQ1).

Эксперименты по оптимизации амплификационной смеси позволили установить следующий ее состав (из расчета на общий объем 25 мкл): 2,5 мкл 10 ПЦР-буфера, 0,6 мкл смеси дНТФ (10 мМ), 2 мкл смеси олигонуклеотидов (5 пмоль/мкл каждого праймера и 2,5 пмоль/мкл зонда), 0,9 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 5 мкл пробы ДНК и 14 мкл деионизованной воды.

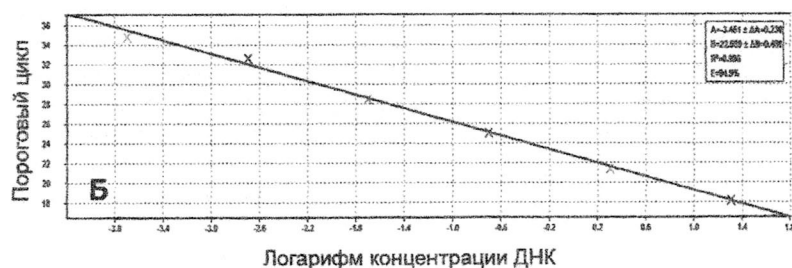
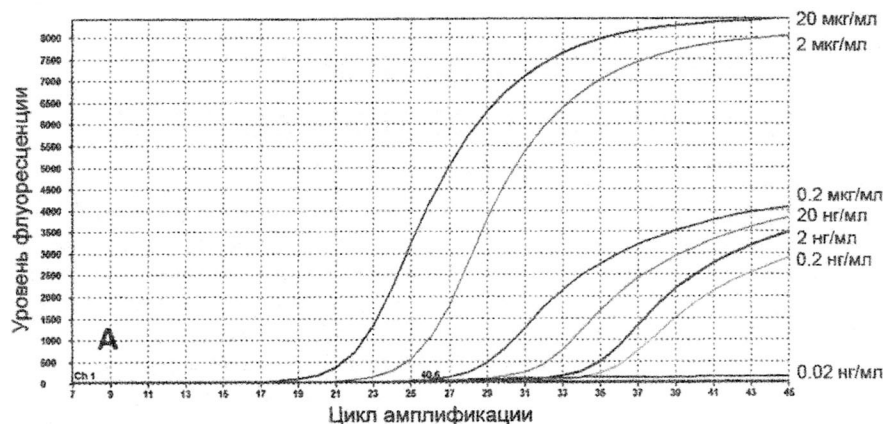
Результаты оптимизации температуры отжига праймеров приведены в таблице. Согласно полученным данным, наилучшие показатели

ПЦР обеспечивала установка температуры отжига на уровне 60 °C. Таким образом, оптимальным режимом амплификации для исследуемой тест-системы был признан следующий: начальная денатурация в течение 3 мин. при 94 °C и 45 циклов амплификации: 5 с при 94 °C и 30 с при 60 °C.

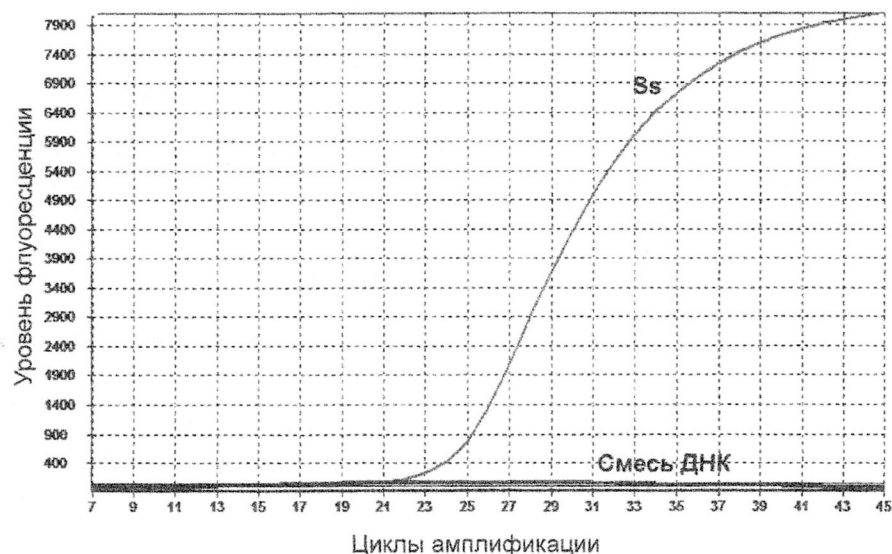
Оценка чувствительности разрабатываемой тест-системы позволила определить порог детекции, равный 0,2 нг/мл (рис. 3, А). Стандартная кривая регрессии, построенная для рабочего диапазона концентрации (0,2 нг/мл – 20 мкг/мл), показала высокую степень линейности (рис. 3, Б).

Оценка видоспецифичности разработанной тест-системы, проведенная с использованием образцов ДНК целевого и некоторых других патогенов картофеля, показала высокий уровень селективности подобранных праймеров, в то время как образец ДНК *S. subterranea* давал четкий и устойчивый сигнал, уровень флуоресцентности в ячейке со смесью ДНК других патогенов не превышал порогового значения (рис. 4).

Проведенные исследования показали, что разработанная тест-система обеспечивает необходимую селективность в отношении ДНК возбудителя порошистой парши *S. subterranea*, а подобранные условия проведения реакции обеспечивают максимально высокий уровень флуоресцентного сигнала. Установленная чувствительность тест-системы, равная 0,2 нг/мл, приблизительно соответствует 6–9 копиям патогена. Теоретический рассчитанный предел чувствительности для анализа методом количественного ПЦР в реальном времени составляет 2,5–3 геном-эквива-



3. А – чувствительность диагностической тест-системы для выявления *Spongospora subterranea* при разных концентрациях ДНК патогена;
 Б – кривая регрессии для рабочего диапазона концентраций ДНК *S. subterranea* ($y = -3,451x + 22,589$, $R^2 = 0,996$)



4. Оценка видоспецифичности тест-системы для выявления и идентификации возбудителя порошистой парши картофеля. Обозначения: Ss – *Spongospora subterranea*; Смесь ДНК – смесь ДНК *A. alternata*, *A. solani*, *R. solani* и *Ph. infestans*

лента [3], хотя на практике достижимый предел чувствительности оказывается несколько выше, варьируя для различных тест-систем в пределах 5–10 геном-эквивалентов. Таким образом, тест-система для диагностики *S. subterranea* является высокочувствительной и, следовательно, перспективной для практического применения при анализе семенного материала на возможную зараженность порошистой паршой, а также для контроля этого заболевания во время вегетационного сезона и при хранении, в том числе и при низких уровнях инфекционной нагрузки.

Исследование было выполнено при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-04109; разработка и лабораторное тестирование диагностических микроматриц).

ЛИТЕРАТУРА

1. Arif M., Torrance L., Reavy B. Acquisition and transmission of potato mop-top furovirus by a culture of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* derived from a single cystosorus // Annals of Applied Biology, 1995, № 126, pp. 493–503.
2. Bouчек-Mechiche K., Montfort F., Metz U, Evaluation of the Sss AgriStrip rapid diagnostic test for the detection of *Spongospora subterranea* on potato tubers // European Journal of Plant Pathology, 2011, № 31(2), pp. 277–287.
3. Forootan A., Sjoback R., Bjorkman J. et al. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR) // Biomolecular Detection and Quantification, 2017, № 12, pp. 1–6.
4. Gau R.D., Merz U., Falloon R.E., Brunner P.C. Global genetics and invasion history of the potato powdery scab pathogen, *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* // PloS ONE, 2013, № 8(6), e67944.
5. Hernandez Maldonado M.L., Falloon R.E., Butler R.C. et al. *Spongospora subterranea* root infection assessed in two potato cultivars differing in susceptibility to tuber powdery scab // Plant Pathology, 2013, № 62, pp. 1089–1096.
6. Qu X., Christ B.J. Single cystosorus isolate and restriction fragment length polymorphism characterization of the obligate biotroph *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* // Phytopathology, 2006, № 96(10), pp. 1157–1163.

7. Simango K., van der Waals J.E. Effects of different soil treatments on the development of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in potato roots and tubers in the greenhouse // Potato research, 2017, № 60, pp. 47–60.

8. van der Graaf P., Lees A.K., Cullen D.W. et al. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR // European Journal of Plant Pathology, 2003, № 109, pp. 89–97.

9. Ward L.I., Beales P.A., Barnes A.V. et al. A real-time PCR assay based method for routine diagnosis of *Spongospora subterranea* on potato tubers // Journal of Phytopathology, № 152, pp. 633–638.

Аннотация. Порошистая парша картофеля (возбудитель *Spongospora subterranea*) широко распространена во многих регионах мира. Болезнь вызывает существенные потери урожая, связанные с подавлением роста и развития растений, ухудшением качества клубней и облегчением развития вторичных клубневых инфекций. В России диагностика патогена проводится преимущественно методами визуального осмотра и микроскопирования, не обеспечивающими достаточно высокую эффективность анализа. Приведены результаты разработки новой тест-системы для выявления и идентификации *S. subterranea* методом ПЦР в реальном времени и показана ее высокая чувствительность и селективность, перспективность применения на практике.

Ключевые слова. *Spongospora subterranea*, картофель, ПЦР в реальном времени, диагностика заболеваний.

Abstract. Powdery scab of potato caused by *Spongospora subterranea* is common for many countries and regions. The disease causes significant yield losses resulted from suppression of the growth and development of plants, low tuber quality and facilitation of development of secondary tuber infections. In Russia< diagnostics of this disease occurs mainly by visual examination and microscoping, which do not provide a sufficient analytic accuracy. This paper describes the development of a new diagnostic system for detection and identification of *S. subterranea* by real-time PCR, its assessment for sensitivity and specificity, and prospects for its practical use.

Keywords. *Spongospora subterranea*, potato, real-time PCR, disease diagnostics.

ООО «ГенБит»,
 Филиал ФГБУ «Россельхозцентр»
 по Ленинградской области,
 Всероссийский НИИ фитопатологии

УДК 632.727

Мароккская саранча в Ставропольском крае

П.Д. СТАМО,

В.Г. КОВАЛЕНКОВ,
 главный научный сотрудник
 Всероссийского НИИ
 биологической защиты растений,
 доктор сельскохозяйственных наук
 e-mail: predgor_stazr@mail.ru
О.В. КУЗНЕЦОВА,
 заместитель руководителя филиала
 ФГБУ «Россельхозцентр»
 по Ставропольскому краю
 e-mail: skstazr@mail.ru
Н.М. ТЮРИНА,
 научный сотрудник
 Всероссийского НИИ
 биологической защиты растений

Накопленный специалистами краевой фитосанитарной службы опыт по контролю за развитием традиционных видов саранчовых – итальянского пруса (*Calliptamus italicus* L.) и азиатской перелетной саранчи (*Locusta migratoria* L.) позволил разработать комплекс эффективных защитных мер. Фенология их развития во все годы была приурочена к первичным очагам обитания, тщательно отслеживалась и достоверно прогнозировалась. В итоге заселение и повреждение возделываемых культур исключались.

Массовое размножение мароккской саранчи (*Doclostaurus maroccanus* Thnb.) на Ставрополье в 2012 г. [3] потребовало анализа условий, причин и последствий осложнения фитосанитарной обстановки, прогноза возможных ее изменений, поиска эффективных методов мониторинга и борьбы.

В условиях активного размножения стадных саранчовых признано важным не ограничиваться учетами и наблюдениями на специально выделенных стационарных участках, как практиковалось в предыдущие годы по рекомендации М.В. Столя-

рова [5], а для получения более полной всеохватывающей информации о стремительно изменяющихся ареалах, численности и оперативных обработках в каждом из районов привлечь землевладельцев всех форм собственности – от фермеров, арендаторов до руководителей и агрономов крупных коллективных хозяйств. Под методическим руководством специалистов краевой службы Россельхозцентра все они скоординированно участвуют в решении главной задачи: не допустить заселения сельскохозяйственных культур и потерь урожая. Проведенные обследования на выявление саранчовых в 2016 г. охватили площадь 843,9 тыс. га, а в 2017 г. – 1236 тыс. га.

Своеобразие сложившейся ситуации заключается в том, что существенно изменились ранее описанные ортоптерологами циклы развития саранчовых (годы активного размножения и депрессий), соотношение в видовом составе с различающимися сроками отрождения, переходами из одного возраста в последующие и чувствительностью к применяемым инсектицидам. Заняв доминирующее положение, мароккская саранча сократила присутствие итальянского пруса до 24 %, а азиатской саранчи – до 18 %. Стремительно пополнив первичные очаги традиционных видов саранчовых, она в десяти районах захватила участки с разнообразными растительными формациями как среди агроландшафтов, так и за их пределами. Многочисленные скопления стали формироваться в непосредственной близости от посевов сельскохозяйственных культур, в