

<sup>1</sup>С. Е. Головин, д. с.-х. н.,

<sup>2</sup>М. Б. Копина, к. с.-х. н.

<sup>1</sup>ФГБНУ ВСТИСП, г. Москва, <sup>2</sup>ФГБУ ВНИИКР, Быково

<sup>1</sup>block2410@yandex.ru, <sup>2</sup>marija508a@mail.ru

УДК 581.1

DOI 10.31676/2073-4948-2018-55-246-249

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗОНДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФИТОФТОРОЗОВ МАЛИНЫ И ЗЕМЛЯНИКИ ПРИ ПОСТАНОВКЕ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

**Резюме.** В результате исследований была разработана методика проведения мультиплексной ПЦР «в реальном времени» для идентификации основных возбудителей фитопфторозных корневых гнилей малины и земляники, в том числе и карантинного биотипа *Ph. fragariae*. Подобранные зонды позволяли достоверно идентифицировать возбудителей фитопфторозных корневых гнилей малины и земляники в концентрации от  $2,0 \times 10^{-5}$  мг/мл до  $3,3 \times 10^{-7}$  мг/мл.

**Ключевые слова:** фитопфторозные корневые гнили, малина и земляника, диагностика, ПЦР «в реальном времени».

**Summary.** As a result of the research, a technique for multiplex PCR “real-time” was elaborated to identify the main pathogens of phytophthora root rots of raspberry and strawberry, including quarantine biotype *Ph. fragariae*. The selected probes allowed to reliably identify the causative agents of late blight root rot of raspberry and strawberry in a concentration from  $2.0 \times 10^{-5}$  mg/ml to  $3.3 \times 10^{-7}$  mg/ml.

**Keywords:** phytophthora root rot, raspberry and strawberry, diagnostics, real-time PCR.

### Введение

Корневые гнили малины и земляники, вызываемые возбудителями рода *Phytophthora*, являются наиболее вредоносными и малоизученными болезнями этих культур. В видовом составе возбудителей фитопфторозов малины и земляники насчитывается более 10 видов из рода *Phytophthora* [1, 2]. Исключительно вредоносной болезнью этих культур является гниль корней, вызываемая карантинным объектом *Ph. fragariae* Nickm.

Для своевременной и точной идентификации и обнаружения возбудителей необходима эффективная диагностика. Из-за нехватки устойчивых морфологических признаков возникают трудности диагностики представителей рода *Phytophthora* до конкретного вида [3]. Необходимость разработки и усовершенствования молекулярных методов диагностики и идентификации фитопфторозов малины и земляники обуславливает актуальность и практическую значимость настоящего исследования.

### Материалы и методы

В работе использовали 8 штаммов культур *Phytophthora* sp., 6 из которых – возбудители фитопфторозов малины и земляники (годы проведения исследований – 2011-2013).

Выделение ДНК из растительного материала и чистых культур проводили следующими методами: с использованием наборов «Проба ГС», («ДНК-Технология», Москва); «ДНК-Экстран», «Сорб-ГМО-А», «Сорб-С» («Синтол», Москва); на основе метода выделения СТАВ-SDS (<http://pcr-rus.narod.ru/protocols.html>) в отдельные этапы которого были внесены изменения, в соответствии с инструкцией к набору «Loewe» (Германия), для диагностики *Phytoplasma* в сосудистой ткани винограда [4, 5], а также согласно методике описанной J.J. Doyle [6].

Аmplификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США). Для проведения ПЦР «в реальном времени» были разработаны универсальные праймеры и четыре специфичных зонда. Подбор праймеров и зондов осуществлялся на основе гена Ypt [7].

### Результаты и обсуждение

Чувствительность метода диагностики была проверена с помощью ПЦР «в реальном времени», с образцами последовательных разведений суспензии, содержащей известное количество мицелия. Образцы ДНК каждого разведения возбудителя фитофтороза ставили с подобранным видоспецифичным зондом. Результаты сравнений представлены в таблице. Из таблицы видно, что концентрация мицелия влияла на значение порогового цикла Ct. С уменьшением концентрации, увеличивалось значение порогового цикла, что указывало на снижение содержащейся ДНК в образце. Таким образом, чем ниже был предел обнаружения возбудителя фитофтороза, тем выше была чувствительность выбранного зонда.

#### Таблица.

**Значение Ct при разных концентрациях мицелия возбудителя фитофтороза при постановке ПЦР «в реальном времени»**

<i>Ph. citricola</i> – зонд Ph.cit								
Концентрация мицелия, мг/мл	3,3x10 <sup>1</sup>	3,3x10 <sup>-1</sup>	3,3x10 <sup>-2</sup>	3,3x10 <sup>-3</sup>	3,3x10 <sup>-4</sup>	3,3x10 <sup>-5</sup>	3,3x10 <sup>-6</sup>	3,3x10 <sup>-7</sup>
Значение Ct	23,01	24,74	27,25	29,65	33,38	34,37	35,60	37,45
<i>Ph. cactorum</i> - зонд Ph.cac								
Концентрация мицелия, мг/мл	2,7x10 <sup>1</sup>	2,7x10 <sup>-1</sup>	2,7x10 <sup>-2</sup>	2,7x10 <sup>-3</sup>	2,7x10 <sup>-4</sup>	2,7x10 <sup>-5</sup>	2,7x10 <sup>-6</sup>	2,7x10 <sup>-7</sup>
Значение Ct	22,81	26,16	28,64	31,34	34,88	36,31	35,97	NA
<i>Ph. nicotianae</i> - зонд Ph.nic								
Концентрация мицелия, мг/мл	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>-1</sup>	2,0x10 <sup>-2</sup>	2,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-4</sup>	2,0x10 <sup>-5</sup>	2,0x10 <sup>-6</sup>	2,0x10 <sup>-7</sup>
Значение Ct	22,89	27,23	28,97	32,27	34,64	38,44	NA*	NA

Примечание: NA \* - отсутствие сигнала флуоресценции

Применение зонда, подобранного для идентификации *Ph. citricola*, позволяло выявить данный вид возбудителя в концентрации до  $3,3 \times 10^{-7}$  мг/мл. В то время как другие зонды при таком количестве мицелия не были способны выявлять заданный вид патогена. Такая чувствительность была наиболее высокой среди четырех подобранных зондов. Зонд, специфичный для *Ph. nicotianaе*, характеризовала более низкая чувствительность, она составляла  $2,0 \times 10^{-5}$  мг/мл. Следует отметить, что в таких низких концентрациях возбудитель в растительном материале встречается крайне редко.

К сожалению, в достаточном количестве нет опубликованных данных по чувствительности разработанных методов для выявления фитофторозов ягодных культур с применением ПЦР «в реальном времени». Так Р. J. M. Vonants [8] с соавторами, проводят сравнение ПЦР с методом Дункана, указывая на высокую чувствительность и специфичность первого метода. В проведенных этой группой ученых экспериментами ПЦР в различных форматах выявлял  $10^{-16}$  г чистой ДНК *Ph. fragariae*, что соответствует 1/60 части ядра. Такую чувствительность авторы связывают с мультикопийностью участка rDNA.

Согласно зарубежным научным работам, на практике применение ПЦР позволяет выявлять 5-10 зооспор патогена [8], что соответствует количеству спор, необходимых для заражения биоприманки [9]. В наших исследованиях предел обнаружения разработанных видоспецифичных проб был связан с количеством мицелия и других пропагул *Phytophthora sp.* в пораженной ткани биоприманки. Подобранные нами зонды позволяли достоверно идентифицировать возбудителей фитофторозных корневых гнилей в концентрации от  $2,0 \times 10^{-5}$  мг/мл до  $3,3 \times 10^{-7}$  мг/мл.

В результате проведенных экспериментов установлены оптимальная концентрация зонда – 5 пкмоль/мкл и оптимальный температурный режим отжига проб –  $+53,2^\circ\text{C}$  [4, 5]. Была также показана высокая специфичность разработанного метода, при котором только в положительных образцах наблюдалась детекция по соответствующему красителю. В состав реакционной смеси входила пара праймеров универсальных для рода *Phytophthora* и четыре зонда, специфичных для *Ph. fragariae*, *Ph. cactorum*, *Ph. nicotianaе* и *Ph. citricola*.

### Заключение

Таким образом, нами была разработана методика проведения мультиплексной ПЦР «в реальном времени» для идентификации основных возбудителей фитофторозов малины и земляники, в том числе и карантинного биотипа *Ph. fragariae*. Подобранные зонды позволяли достоверно идентифицировать возбудителей фитофторозных корневых гнилей малины и земляники в концентрации от  $2,0 \times 10^{-5}$  мг/мл до  $3,3 \times 10^{-7}$  мг/мл.

**Список использованной литературы**

1. Головин С. Е. Проблемы распознавания фитофторовых грибов на ягодных, декоративных и цветочных культурах и разработка способов их диагностики // Плодоводство и ягодоводство России, 1999. – Т. 6. – С. 197-204.
2. Duncan J. M., Kennedy D. M., Seemuller E. Identities and pathogenicities of *Phytophthora* sp. causing root rot of red raspberry // Plant Pathology, 1987. – V. 36. – № 7. – P. 276-289.
3. Li M., Inada M., Watanabe H., Suga H., Kageyama K. Simultaneous Detection and Quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* and Distribution Analyses in Strawberry Greenhouse by Duplex Real-time PCR // Microbes and Environments, 2013. – Vol. 28. – N. 2. – P. 195-203.
4. Копина М. Б. Фитофторозные корневые гнили малины и земляники, методы их диагностики: Автореф. дисс. ... к. с.-х. наук. – М., 2013. – 23 с.
5. Головин С. Е., Копина М. Б. Фитофторозные корневые и прикорневые гнили малины и земляники, современные методы их диагностики (монография). – М.: ГНУ ВСТИСП, 2014. – 196 с.
6. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. Life technolog. inc., 1990. – Vol. 12. – P. 13-15.
7. Schena L., Duncan J. M., Cooke D. E. L. Development and application of a PCR-based molecular tool box for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystem // Plant Path., 2008. – V. 57. – № 7. – P. 64-75.
8. Bonants P. J. M., van Gent-Pelzer M., Hoofman R., Cooke D. E. L., Guy D. C., Duncan J. M. A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real-time quantitative fluorescence, for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants // European Journal of Plant Pathology, 2004. – V. 110. – P. 689-702.
9. Duncan J. M., Kennedy D. M. Effect of temperature and host genotype on the production of inoculum by *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* from the roots of infected strawberry plants // Plant Pathology, 1995. – V. 44. – № 1. – P. 10-21.

**<sup>1</sup>S. E. Golovin, <sup>2</sup>M. B. Kopina**

<sup>1</sup> FSBSI ARHIBAN, Moscow, Russia,

<sup>2</sup>All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Moscow region, Russia

**DETERMINATION OF SENSITIVITY OF PROBES FOR THE DIAGNOSIS  
OF PHYTOPHTHORA BLIGHT OF RASPBERRY AND STRAWBERRY  
IN THE SETTING OF PCR “IN REAL TIME”**