

УДК 631.523:576.3(470)

НАБОРЫ ДЛЯ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ, ВАЖНЫХ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И КАРАНТИННЫХ СЛУЖБ

Рязанцев Д.Ю.,^{1,2} Стахеев А.А.,¹ Завриев С.К.¹

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

² – ООО «АгроДиагностика»
г. Москва, Россия

Растения подвержены различным грибковым, бактериальным и вирусным инфекциям, приводящим к значительным потерям урожая. Именно поэтому разработка легких в освоении быстрых и эффективных методов диагностики фитопатогенов является важной задачей. Традиционные микробиологические методы и иммуноферментный анализ имеют ряд ограничений, поэтому в последние годы для детекции и идентификации фитопатогенов используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Модификации ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов (ПЦР в формате FLASH - FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization, в общем аналогичная формату FEP - Fluorescence End Point; а также ПЦР в режиме «реального времени») оптимально подходят для рутинной диагностики фитопатогенов. Преимущества FLASH-ПЦР заключаются в использовании недорогого оборудования российского производства, сокращении времени на анализ и предотвращении риска загрязнения рабочего пространства. Тогда как тест-системы в формате «реального времени» позволяют проводить количественную оценку содержания патогена.

Нами разработаны тест-системы для диагностики патогенов картофеля (здесь и далее карантинные для Российской Федерации и Евросоюза объекты выделены подчеркиванием): X, Y, A, M и S вирусов картофеля, вируса скручивания листьев картофеля (PLRV), вируса мотельчатости верхушки картофеля (PMTV), андийского латентного вируса картофеля (APLV), андийского вируса крапчатости картофеля (APMV), вириона веретеновидности клубней картофеля (PSTVd), возбудителя кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), бурой гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*), бледной и золотистой картофельных цистообразующих нематод (*Globodera pallida* и *G. rostochiensis*); ряда возбудителей заболеваний растений защищенного грунта: возбудители угловатой пятнистости листьев

(*Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans*), аскохитоза (грибы Ascochyta/Didymella), некроза сердцевины стебля томата (*Pseudomonas corrugata*), черной бактериальной пятнистости томатов (*Xanthomonas campestris*), бактериального рака томатов (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), водянистой гнили плодов (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*); ряда возбудителей заболеваний плодовых культур: возбудителя ожога плодовых (*Erwinia amylovora*), вируса шарки сливы (PPV), плодовой средиземноморской мухи (*Ceratitis capitata*); основных древесных нематод (*Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*), а также возбудителя ризомании сахарной свеклы (BNYVV). Разработаны тест-системы на ряд возбудителей болезней злаковых: возбудителя бактериального вилта кукурузы (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*), септориоза злаков (*Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum*), фузариозов злаков – *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. cerealis*. Разработаны и тест-системы обнаружения возбудителей фузариозов злаков, сгруппированные по спектру продуцируемых ими токсинов: *F. graminearum* и *F. culmorum* – токсины DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUSX, ZEA, *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae* – токсины T-2, HT-2, DAS, NEO, ZEA, *F. poae* – токсины NIV, FUSX, T-2, HT-2, DAS, ZEA, *F. avenaceum* и *F. tricinctum* – токсины MON, BEA, ENN;

Для контроля правильности выделения тотальной РНК из растений картофеля и реакции обратной транскрипции разработана система обнаружения мРНК гена актина картофеля. Специфичность диагностических тест-систем обеспечивается парой праймеров, которые отжигаются с ДНК/кДНК максимального количества штаммов и изолятов конкретных фитопатогенов, но не дают ложноположительных реакций с родственными видами. Флуоресцентно меченые зонды (TaqMan в случае ПЦР в «реальном времени», «молекулярные маячки» в случае ПЦР в формате FLASH) могут быть универсальны для ряда родственных патогенов, так как специфичность обеспечивается праймерами. Разработанные тест-системы соответствуют всем требованиям современных диагностических систем и характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Доступна максимальная автоматизация большинства стадий анализа, что снижает вероятность субъективной оценки. Стандартизация этапов анализа обеспечивается наличием системы контролей, включающей внутренний, положительный и отрицательный контроли. Другими преимуществами подобных тест-систем являются высокая производительность, общее снижение количества манипуляций, компьютеризация ввода и вывода данных, а также со-

вместимость с программным обеспечением для статистического анализа результатов.

Разработанные на основе наших исследований диагностические наборы производятся на базе ООО «АгроДиагностика» (www.agrodiagnostica.ru). В состав каждого набора входят: 50 пробирок с реакционной смесью под парафином, раствор полимеразы, положительный контрольный образец, минеральное масло. Тест-системы прошли испытания в Институте картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха РАСХН (Коренево, Московская обл.), Институте фитопатологии РАСХН (бол. Вяземы, Московская обл.), ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (Быково, Московская обл.), Институте питания РАМН (Москва), Научно-практическом центре по картофелеводству и плодовоовощеводству НАН Беларуси (Самохваловичи, Беларусь), компании HLB (Нидерланды) и ряде других организаций.

УДК 664.8.031:633.63(476.6)

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА МИКРОКЛИМАТ В КАГАТЕ ПРИ ХРАНЕНИИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

**Свиридов А.В.¹, Дорошкевич Е.И.¹, Просвиряков В.В.¹,
Куликовский С.Е.²**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

² – ОАО «Скидельский сахарный комбинат»
г. Скидель, Республика Беларусь

Повышение урожайности корнеплодов – важная задача для агропромышленного комплекса Республики Беларусь. Однако первостепенным делом все же является сохранение выращенной продукции. При хранении корнеплодов в кагатах потери происходят по неизбежным причинам, связанным с биохимическими реакциями дыхания, и по зависимым причинам, вызываемым поражением корнеплодов фитопатогенами.

Интенсивному развитию гнилостных процессов на корнеплодах способствует температура воздуха в кагате. Ее повышение происходит за счет температуры окружающей среды, дыхания корнеплодов и микроорганизмов. Интенсивность тепловыделения резко возрастает при повышении температуры хранения. В результате происходит самосогревание продукции и связанное с ним интенсивное развитие болезнетворных микроорганизмов [1].