

ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПЛАЗМЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВИНОГРАДА НА ЮГЕ РОССИИ

Котляр В.К., Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Степанов И.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар, Россия)
mayyyiva@gmail.com*

Реферат: Одними из опаснейших для винограда патогенов являются фитоплазмы – биотрофные прокариоты, близкие к грамположительным бактериям. Патогенные для растений, в основном они передаются насекомыми, принадлежащими к семействам цикадок. Традиционные подходы к диагностике фитоплазменных заболеваний, как правило, основаны на визуальном определении симптомов, что не дает точного результата. Использование молекулярно-генетических методов позволяет наиболее точно выявить наличие патогенов.

Ключевые слова: Candidatus Phytoplasma vitis, Candidatus Phytoplasma solani, ПЦР в реальном времени

Summary: One of the most dangerous pathogens for grapes are phytoplasmas – biotrophic prokaryotes, close to gram-positive bacteria. They are pathogenic to plants and mainly transmitted by insects belonging to the families of cicadas. Traditional approaches to the diagnosis of phytoplasma diseases, as a rule, are based on visual identification of symptoms, which does not give an accurate result. The use of molecular-genetic methods allows us to detect the presence of pathogens.

Key words: Candidatus Phytoplasma vitis, Candidatus Phytoplasma solani, PCR real-time

Введение. Состав патогенов виноградников зависит от разных причин, в том числе, от географического расположения региона, климатических условий, окружающей дикорастущей флоры и состава насекомых вредителей, являющихся переносчиками вирусов, и бактерий. Одними из опаснейших для винограда патогенов являются фитоплазмы.

Фитоплазмы — это биотрофные прокариоты патогенные для растений, близкие к грамположительным бактериям, в основном, передаются насекомыми, принадлежащими к семействам цикадок (Cicadellidae, Cixiidae). О наличии патогенов данной группы на растениях стало известно лишь несколько десятков лет назад (в 1967 г.) [1].

Традиционные подходы к диагностике фитоплазменных заболеваний, как правило, основаны на визуальном определении симптомов, что не дает точного результата.

Однако в настоящее время решение задач по ограничению развития вирусных и бактериальных инфекций возможно только с использованием молекулярных методов диагностики, в основе которых лежит метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Молекулярно-генетические методы заняли прочную позицию во многих областях сельскохозяйственной биологии и могут использоваться для определения различных патогенов в посадочном материале и обеспечения его чистоты от карантинных заболеваний.

Использование молекулярно-генетических методов позволяет вовремя выявить наличие патогенов, подготовить и провести своевременный комплекс защитных мероприятий, что в последующем обеспечит эффективное развитие растений и здоровье маточных насаждений.

Наиболее эффективными методами идентификации можно с уверенностью считать метод ПЦР и ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени). Первый больше подходит для изучения

разнообразия патогенов, а второй для выявления наличия патогена в изучаемом материале и нацелен на массовые тесты.

При заражении фитоплазмами снижение урожая варьирует от незначительного до почти полной его потери на восприимчивых сортах [2-4]. Наиболее вредоносны для винограда два вида фитоплазм: возбудитель золотистого пожелтения *Candidatus Phytoplasma vitis* и возбудитель почернения древесины *Candidatus Phytoplasma solani*.

Значимость ранней точной идентификации связана с тем, что золотистое пожелтение листьев, вызываемое *C. Ph. vitis* Flavescence dorée, является карантинным для РФ и Евросоюза заболеванием, в то время как почернение коры *C. Ph. solani* Bois noir – к списку карантинных не относится. В самом начале развития болезни очень тяжело визуально определить, какими именно группами фитоплазм оно вызвано.

Целью нашего исследования была идентификация патогенов в насаждениях, расположенных в разных географических точках Краснодарского края, и сравнение эффективности коммерческих наборов для выделения ДНК патогена из растительной ткани с модифицированным методом экстракции на основе ЦТАБ-буфера (в основе метода лежит лизис клеток с помощью цетилтриметиламмонийбромидом), при идентификации фитоплазмы с помощью ПЦР в реальном времени.

Объекты и методы исследований. Для исследования был использован растительный материал винограда, листья которого имели визуальные признаки поражения фитоплазмой. ДНК выделяли из пораженных листьев тремя способами – наборами «АгроДиагностика» (АгроДиагностика, Россия) и ЦитоСорб (ООО «Синтол», Россия), а также модифицированным методом ЦТАБ [4].

Идентификацию патогена проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью набора «ФИТОСКРИН» (ООО «Синтол», Россия) на высококачественном современном амплификаторе QuantStudio 6 Pro.

Обсуждение результатов. За время проведения исследований (в 2020 году), был выполнен сбор и проведен анализ на наличие фитоплазменной инфекции 43 образцов винограда из разных зон Краснодарского края и Ростовской области (г. Краснодар, ст. Тамань, г. Волгодонск, г. Анапа).

Отработаны методики проб-подготовки материала к ПЦР-РВ и проведено сравнение эффективности трех разных методов экстракции ДНК. Было показано, что для выделения ДНК возбудителя золотистого пожелтения винограда и почернения коры для выявления патогена методом ПЦР в реальном времени эффективнее всего модифицированный метод ЦТАБ, не смотря на большее время, необходимое для выделения в сравнении с коммерческими наборами [6].

Как правило, выявить зараженные патогенным организмом растения на ранних этапах поражения очень сложно, т.к. симптомы можно перепутать с минеральным голоданием, краснухой или недостаточным поливом (пожелтение, карликовость). Поскольку фитоплазмы переносятся с растения на растение с помощью насекомых-переносчиков (цикадки, тли, белокрылки), риск распространения заболевания на обширных территориях достаточно велик. Не смотря на большое количество собранного материала, соответствующего по визуальным признакам данному заболеванию, было подтверждено наличие патогена *Candidatus Phytoplasma solani*, вызывающего почернение древесины только в одном образце из исследуемых (рис.).

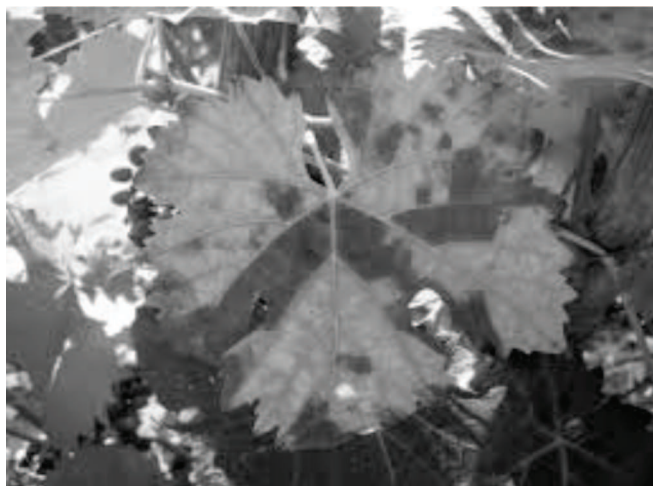


Рис. Пораженный фитоплазмами лист винограда

Выводы. Традиционные подходы к диагностике фитоплазменных заболеваний, как правило, основаны на визуальном определении симптомов, что не дает точного результата. Наиболее эффективными методами идентификации являются ПЦР и ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени). Использование молекулярно-генетических методов позволяет проводить точную диагностику наличия патогенов.

Так, нами при обследовании 43 образцов винограда, с визуальными признаками, близкими к проявлению фитоплазменной инфекции, патоген *Candidatus Phytoplasma solani* обнаружен с помощью метода ПЦР в реальном времени только в одном образце.

Применение ДНК-методов идентификации патогенов в питомниководческом процессе позволит производить высококачественный отечественный посадочный материал, свободный от хронических инфекций и не допустить распространения болезни на здоровые насаждения.

Литература

1. Bertaccini A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology // *Frontiers in bioscience*. 2006. P. 673-689.
2. Angelini E., Bianchi G.L., Filippin L., Morassutti C., Borgo M. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay // *Journal of Microbiological Methods*. 2007. №68(3) P.613-622.
3. Choueiri E., Jreijiri F., El Zammam S., Verdin E., Salar P., Danet J.L., Bové J., Garnier M. First report of grapevine “Bois Noir” disease and a new phytoplasma infecting solanaceous plants in Lebanon // *Plant Disease*. 2002. №86(6). P. 697-697
4. Hren M., Boben L., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics // *Plant Pathology*. 2007. №56(5). P. 785-796.
5. Porebski S., Bailey L. G., Baum B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components // *Plant molecular biology reporter*. 1997. Vol.15. №1. P. 8-15.
6. Котляр В.К., Макаркина М.В., Степанов И.В., Ильницкая Е.Т. Подбор оптимальной методики выделения ДНК возбудителя золотистого пожелтения винограда и почернения коры для выявления патогена методом ПЦР в реальном времени [Электронный ресурс] // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2021. № 67(1). С. 283–293