

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФИТОПЛАЗМОЗОВ И ФУЗАРИОЗОВ В НЕКОТОРЫХ РАЙОНАХ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Башкирова Ида Геннадьевна, младший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»; аспирант кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т. ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», E-mail: bashkirovaaid@mail.ru

Шварцев Алексей Анатольевич, научный сотрудник ООО «НПФ Синтол»; аспирант кафедры генетики, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Смирнова Ирина Павловна, д.б.н., профессор кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т. ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Аннотация: В работе проводили исследование распространения особо опасных фитопатогенов – возбудителя пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*) и возбудителей корневых гнилей (*Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*) в трех районах Московской области.

Ключевые слова: яблоня, фитоплазма, фузариум, молекулярная диагностика, карантин растений

Введение. Яблоня (*Malus* spp.) считается одной из самых значимых плодовых культур России. Яблоня относится к семейству Розоцветные (Rosaceae) и входит в группу плодовых культур с яблочковидными плодами [3]. Семечковые культуры подвергаются заражению различными микроорганизмами, среди них фитоплазма *Candidatus Phytoplasma mali* (*Ca. P. mali*) и некоторые виды грибов из рода *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*). При заражении фитоплазмой снижение урожая может достигнуть 95%, снижение массы плодов до 30-40%, ухудшается вкус. Микроорганизм *Ca. P. mali* включен в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, как ограниченно распространенный вид [1; 2]. Некоторые виды грибов рода *Fusarium* повреждают плодовые семечковые и косточковые культуры. Фузариозное заражение на яблони в основном представлено в виде корневых гнилей. Потери урожая могут достигать 30-100%. Исследуемые виды грибов – *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum* считаются полифагами, которые повреждают различные виды растений, а также накапливаются в почве [5]. Климатические условия Московской области

благоприятны для развития и распространения исследуемых фитопатогенов. Поэтому, своевременное выявление и принятие мер по ограничению распространения микроорганизмов является одной из основных задач исследования.

Цель. Оценить потенциальное распространение фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* и *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum* в некоторых районах Московской области. Провести отбор образцов в посадках семечковых культур и исследовать их на наличие исследуемых фитопатогенов.

Материалы и методы. В период с апреля по сентябрь 2021 года было проанализировано 253 образца растительного материала *Malus* spp., отобранных в Богородском городском округе, Сергиево-Посадском ГО и Раменском ГО Московской области.

Экстракцию ДНК осуществляли с помощью наборов реагентов «ЦитоСорб» (для фитоплазмы) и «Сорб-ГМО-Б» (для грибов) отечественной компании ООО «НПФ Синтол» (далее Синтол). Предварительную подготовку образцов растений *Malus* spp. для выделения ДНК проводили по инструкции к наборам. Навеску растительного материала массой 1 г гомогенизировали в 5 мл экстрагирующего буфера в керамической ступке. Полученный экстракт переносили в пробирки объемом 2 мл в количестве 1,5 мл и центрифугировали 5 мин при 7000 об/мин. Далее полученный раствор переносили в новые пробирки объемом 1,5 мл в количестве 500 мкл для выделения ДНК фитоплазмы набором «ЦитоСорб» и 700 мкл для выделения ДНК грибов набором «Сорб-ГМО-Б». Добавляли необходимое количество лизирующего раствора и осуществляли дальнейшую экстракцию НК согласно инструкциям к наборам.

При проведении исследований использовали метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Видовую идентификацию фитоплазмы *Ca. P. mali* проводили с помощью двух тест-систем отечественного производства: «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ» для выявления ДНК фитоплазмы пролиферации яблони (Синтол) и «Фитоплазма пролиферации яблони» (ООО «АгроДиагностика», далее АгроДиагностика). В наборах специфичная реакция на *Ca. P. mali* проходит по каналу флуоресценции FAM (АгроДиагностика) и ROX (Синтол), внутренний положительный контроль (ВПК) по каналу флуоресценции R6G/HEX.

Для диагностики некоторых видов грибов из рода *Fusarium* spp. использовали олигонуклеотиды, подобранные на участок гена 28S-18S рРНК. В реакционную смесь добавляли: прямые праймеры FusDop2_F/ FusDop2_F2, зонды FusDop2_Pb_FAM/ FusDop2_Pb_2FAM и обратные праймеры FusDop2_R/ FusDop2_R2/ FusDop2_R3 для родовой диагностики грибов рода *Fusarium* [4]. Для исключения ложноотрицательных результатов добавляли ВПК по каналу флуоресценции R6G/HEX. ПЦР в реальном времени проводили с использованием 2,5x реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ (Синтол). Состав реакционной смеси на 1 образец (общий объем смеси 25 мкл): готовая реакционная смесь – 10

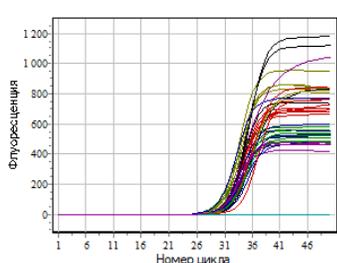
мкл; праймеры по 1 мкл каждого; зонд – 0,5 мкл; MgCl₂ – 1 мкл; деионизированная вода – 9,5 мкл; ДНК – 2 мкл. Программа амплификации: 1) 95°C в течение 5 минут; повтор 45 циклов: 95°C в течение 15 секунд; 60°C в течение 40 секунд. В качестве положительного образца для постановки ПЦР с олигонуклеотидами использовали ДНК вида *F. oxysporum* (Коллекция РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева). Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе DTrime (ДНК-Технология, Россия).

Результаты и их обсуждение. При использовании отечественных тест-систем для идентификации фитоплазмы *Sa. P. mali* и при использовании олигонуклеотидов для родовой дифференциации грибов *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum* получены следующие результаты.

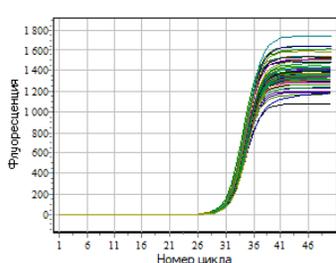
Таблица 1. Результаты диагностики некоторых видов грибов рода *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*)

Внутренний положительный контроль по каналу HEX (Синтол)

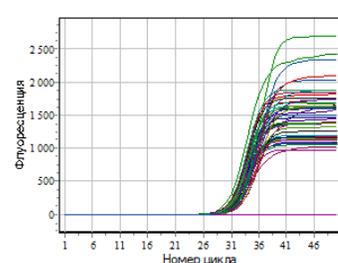
36 обр. + К-в + К+ + К-



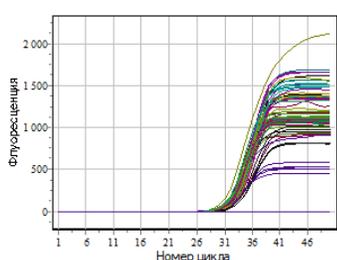
53 обр. + К-в + К+ + К-



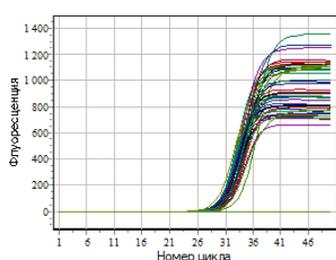
40 обр. + К-в + К+ + К-



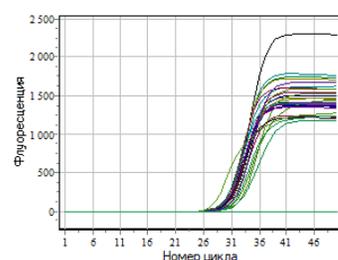
57 обр. + К-в + К+ + К-



44 обр. + К-в + К+ + К-



23 обр. + К-в + К+ + К-

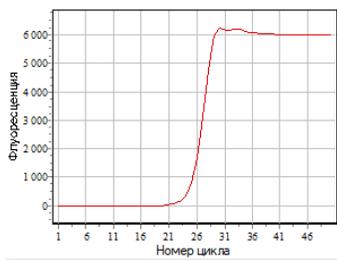


Специфика по каналу FAM (FusDop2_Pb_FAM/FusDop2_Pb_2FAM)

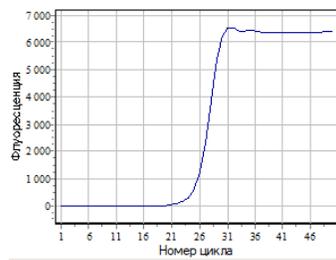
К+ (*F.oxysporum*), 36 обр.

К+ (*F.oxysporum*), 53 обр.

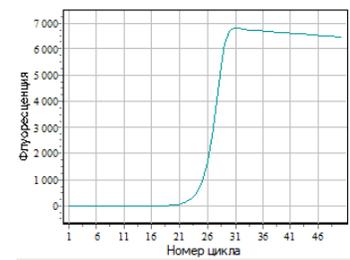
К+ (*F.oxysporum*), 40 обр.



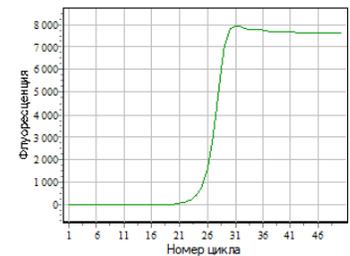
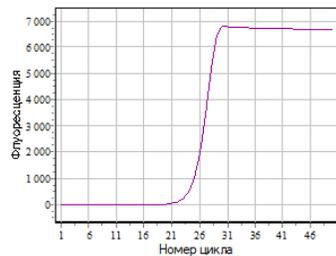
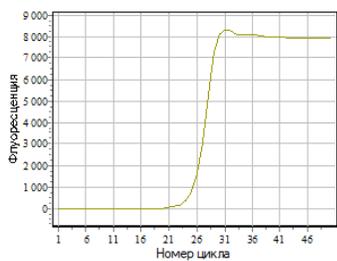
K+ (*F.oxysporum*), 57 обр.



K+ (*F.oxysporum*), 44 обр.



K+ (*F.oxysporum*), 23 обр.



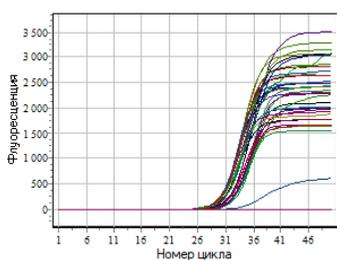
Проанализирован растительный материал яблони из Богородского ГО – 123 образца; Сергиево-Посадского ГО – 40; Раменского ГО – 90. В таблицах 1 и 2 представлены результаты по диагностике растительного материала на наличие возбудителей корневых гнилей (фузариозов) и возбудителя пролиферации яблони.

Таблица 2. Результаты диагностики возбудителя пролиферации яблони

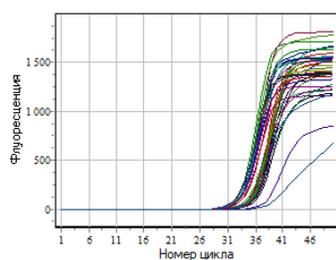
Candidatus Phytoplasma mali

Внутренний положительный контроль по каналу HEX (АгроДиагностика и Синтол)

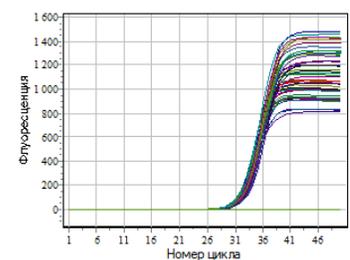
33 обр. + K-в + K+ + K-



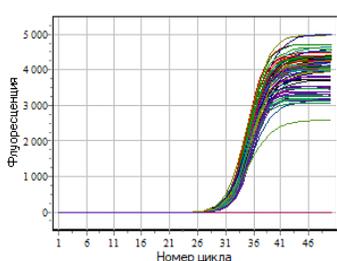
33 обр. + K-в + K+ + K-



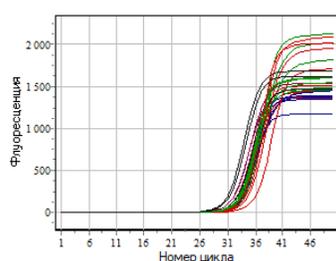
73 обр. + K-в + K+ + K-



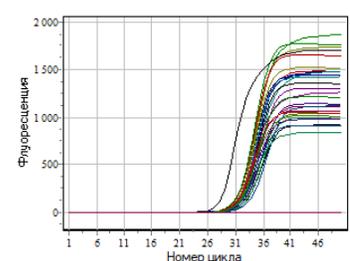
68 обр. + K-в + K+ + K-



23 обр. + K-в + K+ + K-



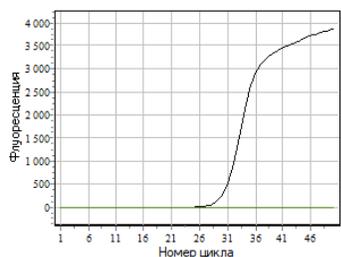
23 обр. + K-в + K+ + K-



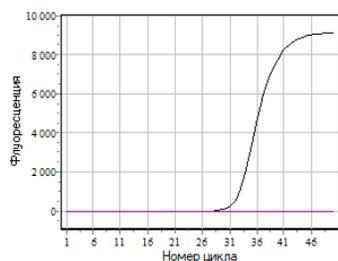
Специфика по каналу FAM (АгроДиагностика)

Специфика по каналу ROX (Синтол)

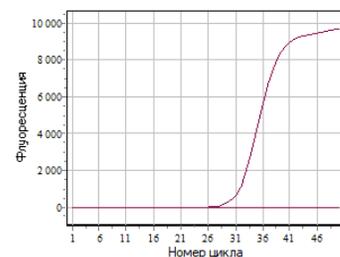
К+(АгроДиагностика), 33 обр.



К+ (АгроДиагностика), 33 обр.

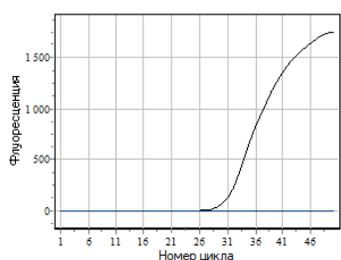


К+ (Синтол), 73 обр.

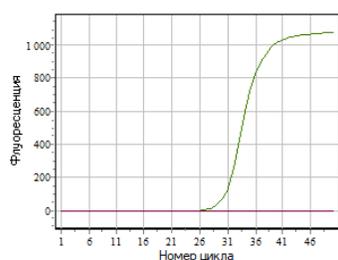


Специфика по каналу ROX (Синтол)

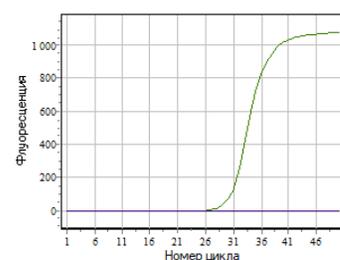
К+ (Синтол), 68 обр.



К+ (Синтол), 23 обр.



К+ (Синтол), 23 обр.



Примечание: обр. – образец; К-в – отрицательный контроль выделения; К+ – положительный контрольный образец; К- – отрицательный контрольный образец (H₂O).

В ходе исследования особо опасный микроорганизм *Candidatus Phytoplasma mali* не был выявлен. Возбудители корневых гнилей – *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum* так же не были выявлены. По значению ВПК прохождение реакции было стабильным, ложноотрицательные результаты и ингибирование реакций отсутствовали.

Заключение. В работе провели диагностику 253 растительных образцов *Malus* spp. из трех районов Московской области. По результатам исследований опасные возбудители фитоплазмозов и фузариозов не были выявлены. В дальнейшем планируется увеличение выборки образцов и проведение повторных исследований на наличие фитоплазмы и грибов рода *Fusarium*.

Библиографический список.

1. Выявление и идентификация возбудителей фитоплазмозов группы *Apple proliferation* на плодовых культурах / И. Г. Башкирова, Г. Н. Матяшова, М. С. Гинс // Российская сельскохозяйственная наука. – 2018. – Вып. 3. – С. 10–14.

2. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2020 году: М-во сельского хозяйства Рос. Федерации. – М.: 2021 – 34 с.
3. Оценка фитосанитарных рисков вредных организмов, связанных с импортированием, экспортированием и перемещением саженцев, подвоев и черенков семечковых плодовых культур: отчет о НИР (промежуточ.). Всероссийский центр карантина растений; под ред. Артемьевой Т.В.; исполн.: Шнейдер Ю.А. [и др.]. – М., 2017. – 440 с. - Инв. № 46-2017 ПО ВНИИКР.
4. Разработка набора реагентов для диагностики фитопатогенных грибов рода *Fusarium* методом ПЦР в реальном времени / А. А. Шварцев, С. А. Блинова, С. В. Сыксин, Я. И. Алексеев // Виноградарство и виноделие. – 2019. – Т. 48. – С. 47–49.
5. Распространение грибов рода *Fusarium* на плодовых культурах юга России / Г. В. Якуба, И. Г. Мищенко // Плодоводство и ягодоводство России. – 2019. – Т. 58. – С. 206–211.

Study of the distribution of phytoplasmosis and fusariosis in certain areas of the Moscow region

Bashkirova I.G., Junior researcher, All-Russian Plant Quarantine Centre,
140150, Russia, Moscow (Bykovo), Pogradichnaya str., 32
Graduate student, People's Friendship University of Russia (RUDN University) 117198,
Russia, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6

Shvartsev A.A., Researcher, LLC Syntol
127434, Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 42
Graduate student, Russian Timiryazev State Agrarian University - Moscow Timiryazev
Agricultural Academy
127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 49

Smirnova I.P., D.Sc. in Biology Sciences
Professor, People's Friendship University of Russia (RUDN University)
117198, Russia, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6

Abstract: In this work, we studied the distribution of especially dangerous phytopathogens - the causative agent of Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*) and causative agents of root rot (*Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*) in three districts of the Moscow region.

Key words: apple, phytoplasma, fusarium, molecular diagnostics, plant quarantine