

Картофелеводство: болезни и защита растений

УДК 635.21:632.3.01/.08:577.2.08

doi: 10.15389/agrobiology.2020.1.77rus

РАЗРАБОТКА НОВЫХ СИСТЕМ ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕКАРАНТИННЫХ ПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.), РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ*А.А. СТАХЕЕВ¹, М.С. ЧИГАРЁВА¹, А.И. УСКОВ², И.В. ШМЫГЛЯ², Ю.А. ВАРИЦЕВ², П.А. ГАЛУШКА², С.К. ЗАВРИЕВ¹

Российская Федерация — один из крупнейших производителей картофеля в мире: за 2018 год посевные площади этой культуры на территории страны составили 310,7 тыс. га, а валовые сборы в промышленном секторе — 7157 тыс. т. Однако для современного картофелеводства характерно прогрессивное распространение вирусных болезней и бактериозов, приводящих к снижению урожая и катастрофическому ухудшению стандартного качества клубней. В настоящее время в картофелеводстве широко применяются классические методы диагностики, в частности растения-индикаторы, серологические и цитологические подходы. Они относительно надежны, но не всегда достаточно чувствительны, требуют высокой квалификации персонала и существенных затрат времени. Современной альтернативой этим методам служат диагностические системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), в частности ее модификации в формате реального времени (количественная ПЦР). В представленном исследовании для шести некарантинных патогенов (некротических штаммов Y вируса картофеля PVY^{N-NTN} и PVY^{N:O}, вируса погрелковости табака, патогенных бактерий *Dickeya solani*, *D. dianthicola*, *Pectobacterium atrosepticum*) впервые в России были разработаны системы диагностики и идентификации в формате количественной ПЦР. Праймеры и флуоресцентно меченные зонды подбирали на основе последовательностей нуклеотидов, представленных в международной базе данных NCBI GenBank, с учетом размера ампликона не более 500 п.н. Специфичность предложенных систем была показана в тестах с генетическим материалом патогенов, таксономически близких или занимающих сходные экологические ниши: ординарный штамм PVY, вирус метельчатости верхушки картофеля, бактерии *Pectobacterium carotovorum*, *D. zeae*. Качество работы предложенных тест-систем также оценивали с использованием растительного материала, предположительно зараженного анализируемыми патогенами. Выделение нуклеиновых кислот осуществляли с использованием комплектов реактивов Проба-НК (для РНК) и Проба-ГС (для ДНК) (ООО «АгроДиагностика», Россия). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Scientific», США). ПЦР проводили в амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия), количественную ПЦР — в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Для оценки возможного ингибирования в реакционную смесь добавляли внутренний контрольный образец (ВКО), представляющий собой плазмиду со специфической вставкой (размер 560 п.н.). Положительные контрольные образцы (ПКО) клонировали с использованием набора Quick-TA kit («Евроген», Россия). Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoVue («GE HealthCare», США). Секвенирование молекул ДНК проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 («Applied Biosystems», США). Аналитическую чувствительность оценивали с использованием количественной ПЦР, при которой в качестве матрицы выступали последовательные 10-кратные разведения плазмидных ДНК (ПКО в четырех независимых повторностях) в диапазоне от 10⁷ до 10⁰ копий на реакцию. Была показана высокая чувствительность разработанных тест-систем, составившая от 10 до 500 копий специфической ДНК на реакцию, а также высокая воспроизводимость (C_v 1,5-2,0 %). Максимальное разгорание разработанных гидролизуемых зондов составило от 1200 до 2000 ед. фона. Универсальность предложенных профилей амплификации может послужить основой для адаптации тест-систем в формат мультиплексной ПЦР. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что разработанные системы с высокой специфичностью и чувствительностью детектируют анализируемые патогены и могут быть использованы в рамках мероприятий по фитосанитарному контролю и рутинной диагностике шести некарантинных патогенов в растениях, посадочном материале и пищевой продукции.

Ключевые слова: диагностика, количественная ПЦР, чувствительность, специфичность, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola*, некротические штаммы Y вируса картофеля, PVY, вирус погрелковости табака.

Картофель — одна из основных сельскохозяйственных культур с общемировым объемом производства около 375 млн т. Существенным

* Статья подготовлена в рамках ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017-2025 годы (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).

фактором, снижающим количество и качество получаемого картофеля, становятся болезни, вызываемые фитопатогенами различной природы, относящимися к разным таксономическим группам: ежегодные потери, связанные с вирусными, составляют 7 % от урожая, с микозами и бактериозами — 14 % (1, 2). В настоящее время известно свыше 50 возбудителей вирусных и бактериальных болезней, выявленных на картофеле в регионах с разнообразными природно-климатическими условиями (3, 4). Вместе с тем при сертификации семенного картофеля в России контролируются лишь некоторые из них, а интегрированная система мониторинга вирусных и бактериальных заболеваний этой культуры отсутствует (5, 6).

Для современного картофелеводства характерно прогрессивное распространение вирусных болезней некротической кольцевой пятнистости клубней и пестростебельности, а также бактериоза черной ножки картофеля, вызывающих, помимо снижения урожая, катастрофическое ухудшение стандартного качества клубней, что становится серьезной проблемой для товарного производства (7).

Кольцевой некроз клубней картофеля (КНKK, образование на клубнях колец и дуг темно-коричневого цвета) вызывают некротические штаммы Y-вируса (potato virus Y, PVY^{N-NTN}). В то же время идентифицированы вызывающие КНKK изоляты, которые обладают серологическими свойствами, характерными для ординарного штамма Y-вируса картофеля (PVY^O). Эти штаммы, выделенные в Европе, отнесены к подгруппе PVY^{N-Wilga} некротических штаммов (по названию сорта, на котором впервые выявлен вирус с подобными свойствами) (8-10). Группа изолятов PVY с аналогичными свойствами, обнаруженных позднее в Северной Америке, получила обозначение PVY^{N:O} (11). Геном PVY представляет собой одноцепочечную РНК длиной около 9700 п.н. На сегодняшний день для всех перечисленных групп изолятов определены структуры полных геномов и их полиморфизм, что значительно упрощает исследования и разработку систем диагностики (12). Пестростебельность картофеля, которая проявляется образованием некротических дуг и пятен как на поверхности клубня, так и внутри паренхимной ткани, вызывается вирусом погресковости табака (tobacco rattle virus, TRV, раттл-вирус), распространяемым почвенными нематодами отряда *Dorylaimida* рода *Trichodorus* (13, 14).

По данным Лаборатории фитопаразитологии ЦПИПЭ РАН, которая ведет изучение распространения нематод-триходорид, в 75 % образцов растений, зараженных триходоридами, обнаруживается раттл-вирус (15). TRV относится к типичным патогенам природно-очаговых заболеваний. Уже в первый год попадания здорового растения картофеля в инфекционный очаг урожай клубней становится нетоварным (16, 17). Вызываемая вирусом болезнь описана во многих странах, а в середине 1970-х годов выявлена на территории бывшего СССР (16). Вирус широко представлен в Нидерландах, Германии, Бельгии, Англии, Франции, Польше, Швеции, Австрии, Финляндии, США, Японии, странах Балтии и России (18-20). Идентификация TRV затруднена, поскольку во многих случаях наблюдается смешанная инфекция (15, 17). Геном TRV состоит из линейной одноцепочечной РНК и включает две части — РНК-1 и РНК-2, общий размер — от 9000 до 11500 п.н. (21). В настоящее время расшифровано значительное количество структур полных геномов этого вируса для изолятов различного географического происхождения (22, 23).

Распространение бактериоза черной ножки картофеля за последние годы заметно прогрессирует. Выявлен ряд новых возбудителей, вызывающих водянистую гниль стеблей и мягкие гнили клубней (24). Симпто-

мы поражения клубней и растений картофеля бактериями рода *Dickeya* spp. во многом сходны с симптомами при заражении бактериями рода *Pectobacterium* spp. (25). Вместе с тем виды *Dickeya* spp. могут вызывать болезнь при наличии небольшого количества инфекционного агента, легче распространяются по сосудистым тканям растений, агрессивнее, а при повышенной температуре поражение мокрой гнилью сильнее, чем в случае инфицирования *Pectobacterium atrosepticum*. Для *Dickeya* spp. характерно распространение в регионах с жарким климатом, однако в связи с локальными изменениями климатических условий отмечено их продвижение в регионы с умеренным климатом, традиционные для производства картофеля. Важным этапом в исследовании этих бактериальных патогенов стала расшифровка структур полных геномов (26–28).

Основной способ радикальной борьбы с вирусными и бактериальными болезнями картофеля заключается в выявлении возбудителей заболеваний на ранних этапах семеноводства с последующей выбраковкой инфицированного материала. Классические методы диагностики надежны, однако зачастую не обладают достаточной чувствительностью, а также требуют высокой квалификации персонала и существенных затрат времени (29). В связи с этим необходимы новые отечественные ПЦР тест-системы для выявления патогенов, ухудшающих качество товарного картофеля и наносящих значительный экономический ущерб.

В настоящем исследовании для шести некарантинных патогенов (некротических штаммов Y вируса картофеля PVY^{N-NTN} и PVY^{N:O}, вируса погрелковости табака, патогенных бактерий *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola*, *Pectobacterium atrosepticum*) впервые в России были разработаны системы диагностики и идентификации в формате количественной ПЦР.

Цель работы — создание оригинальных отечественных систем для идентификации некарантинных патогенов картофеля на основании количественной полимеразной цепной реакции, оценка чувствительности и эффективности этих систем, а также возможности их применения в практике фитопатологического анализа.

Методика. Исследовали выделенные и поддерживаемые во Всероссийском НИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха (ВНИИКХ) образцы фитопатогенов: PVY^{NTN}, PVY^{N:O}, TRV, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola*. Кроме того, были использованы образцы фитопатогенов, близких в таксономическом отношении либо сходных по симптоматике при заражении растений картофеля: PVY (potato virus Y, обычный штамм), вирус метельчатости верхушки картофеля (potato mop top virus, PVTV), *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya zeae*. Эти образцы выделяли при тестировании семенного материала, поступающего из Центрального и Южного федеральных округов Российской Федерации. Для оценки использовали моноклональные антитела фирмы «Bioreba» (Швейцария). Кроме того, предложенные тест-системы были апробированы на генетическом материале 9 образцов клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) различных сортов из Московской области, предположительно зараженных анализируемыми патогенами.

Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием комплектов реактивов Проба-НК (для РНК) и Проба-ГС (для ДНК) (ООО «АгроДиагностика», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Scientific», США).

Дизайн праймеров и флуоресцентно меченных зондов выполняли с помощью выравнивания последовательностей нуклеотидов ряда локусов де-

тектируемых организмов, депонированных в базе данных National Center for Biotechnology Information (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для выравнивания использовали алгоритм ClustalW (30). Подбор и оценку физико-химических свойств олигонуклеотидов осуществляли в программе Oligo v. 6.71 (https://www.oligo.net/oligo_updates.htm).

ПЦР проводили в амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия) в соответствии со следующими программами: для пар праймеров Y-NTN(F-R), Y-NW(F-R), TRV(F-R), Dsol(F-R) — 90 с при 93 °C; 20 с при 93 °C, 5 с при 64 °C, 5 с при 67 °C (5 циклов); 1 с при 93 °C, 5 с при 64 °C, 5 с при 67 °C (40 циклов); для Patr(F-R), Ddi(F-R) — 90 с при 93 °C; 20 с при 93 °C, 5 с при 64 °C, 5 с при 67 °C (5 циклов); 1 с при 93 °C, 5 с при 60 °C (40 циклов). Количественную ПЦР осуществляли в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия) по аналогичным программам амплификации. Для анализа полученных результатов использовался пороговый метод (31). Каждый из образцов ДНК был протестирован в трех повторностях. Состав ПЦР-буфера и методика разделения продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза описаны в более ранних публикациях (32, 33).

Для оценки возможного ингибирования в реакционную смесь добавляли внутренний контрольный образец (ВКО), представляющий собой плазмиду pTZ57R/T со специфической вставкой (размер 560 п.н.), то есть реакция происходила в мультиплексном формате. Положительные контрольные образцы (ПКО) клонировали с использованием набора Quick-TA kit («Евроген», Россия) по протоколу производителя. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoVue («GE Healthcare», США). Секвенирование молекул ДНК проводили в ЗАО «Евроген», используя набор реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 («Applied Biosystems», США), с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 («Applied Biosystems», США).

Аналитическую чувствительность оценивали в количественной ПЦР с последовательными 10-кратными разведениями плазмидной ДНК в качестве матрицы (ПКО в четырех независимых повторностях) в диапазоне от 10^7 до 10^0 (единичные копии) копий на реакцию. Для каждого ПКО строили график линейной зависимости порогового цикла от числа копий специфической ДНК в реакции.

Для оценки воспроизводимости использовали стандартные отклонения $\pm SD$, вычисленные с учетом усредненного значения C_q для серии разведений. Вариабельность значений C_q оценивали с помощью тестирования каждого разведения три раза в трех повторностях. Также вычисляли коэффициенты вариации (C_v , %).

Результаты. На основании анализа последовательностей нуклеотидов, представленных в GenBank для анализируемых патогенов, для дизайна праймеров и зондов мы выбрали следующие локусы: для PVY^{NTN} — ген белка оболочки (GU980964, AF321554, AJ535662, GU550076, AJ315774), для PVY^{N:0} — ген VPg (EF638893, EF638901, EF638902-638892), для TRV — ген РНК-зависимой РНК полимеразы (JX267264-267270, MF918561-918567), для *D. dianthicola* — ген σ -фактора РНК полимеразы (*rpoD*, MH118541, LC275948-275957). Для остальных патогенов использовали маркерные фрагменты последовательностей полных геномов: *P. atrosepticum* (CP024956, CP009125, CP007744), *D. solani* (CP024710, CP017453, CP016928). При подборе праймеров выравнивали соответствующие локусы целевых патогенов и близкородственных таксонов. Также принимали во внимание желательную температуру отжига праймеров не ниже 60 °C. В итоге 4 пары прай-

меров имели расчетную температуру отжига 64 °С, 2 пары — 60 °С. Структура и свойства разработанных праймеров, а также размеры продуктов амплификации приведены в таблице 1.

1. Характеристика праймеров, разработанных для идентификации шести некарантинных патогенов картофеля (*Solanum tuberosum* L.)

Патоген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	T ₀ , °С	Размер ампликона, п.н.
PVY ^{NTN}	Y-NTNF: TGAACCAATCGTTGAGAAACA Y-NTNR: GACTGATGCCACCGTCGT	60	290
PVY ^{N:0}	Y-N0F: CAAGTCAAGCAGGAGGTTTG Y-N0R: CCCAGTCTGCCTTAGTTTA	60	350
TRV	TRVF: TTTCTTACATTCATGACTGGCT TRVR: TTGACCAACTCTCGCGGTAC	60	320
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	PatrF: CAGTAGGTTTGGGAGCAGCC PatrR: CCACTACCGATGATGCTCCC	64	280
<i>Dickeya solani</i>	DsolF: ATGTAATAATCAGACATGTTGCTT DsolR: TGTATCCTGATTAATTTGTGATCC	60	200
<i>D. dianthicola</i>	DdiF: TGTCCGATTTGATCACCGT DdiR: ATGCTGTTGTCATCATCGGAC	64	160

Примечание. PVY^{NTN} — Y вирус картофеля (штамм NTN), PVY^{N:0} — Y вирус картофеля (штамм N:0), TRV — вирус погрешности табака; T₀ — расчетная температура отжига праймеров.

Для оценки специфичности разработанных праймеров, помимо ДНК или кДНК анализируемых патогенов, использовали генетический материал близкородственных или занимающих сходные экологические ниши организмов, таких как обычный штамм PVY, вирус метельчатости верхушки картофеля (PVTV), бактерии *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya zeae*. Электрофоретический анализ продуктов амплификации показал, что все использованные пары праймеров строго специфичны. В дальнейшем это был анализ в формате количественной ПЦР (табл. 2).

2. Тестирование специфичности праймеров, разработанных для идентификации шести некарантинных патогенов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) методом количественной ПЦР

Патоген	Праймер					
	Y-NTNF-R	Y-NOF-R	TRVF-R	PatrF-R	DsolF-R	DdiF-R
PVY ^{NTN}	+	-	-	-	-	-
PVY ^{N:0}	-	-	-	-	-	-
PVY	-	-	+	-	-	-
TRV	-	-	-	-	-	-
PVTV	-	-	-	-	-	-
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	-	-	-	+	-	-
<i>P. carotovorum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dickeya solani</i>	-	-	-	-	+	-
<i>D. dianthicola</i>	-	-	-	-	-	+
<i>D. zeae</i>	-	-	-	-	-	+

Примечание. PVY — Y вирус картофеля (обычный штамм), PVY^{NTN} — PVY (штамм NTN), PVY^{N:0} — PVY (штамм N:0), TRV — вирус погрешности табака, PVTV — вирус метельчатости верхушки картофеля. В скобках приведены средние значения пороговых циклов по трем повторностям; «+» — положительный результат, «-» — отрицательный результат.

3. Зонды и аналитическая чувствительность тест-систем, разработанных для идентификации шести некарантинных патогенов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) методом количественной ПЦР

Патоген	Нуклеотидная последовательность зонда 5'→3'	T ₀ , °С	Чувствительность, число копий ДНК на реакцию
PVY ^{NTN}	(BHQ1)-TGCGCCTTCAT(FAMdT)TGAATGTGCGC	82	1×10 ¹
PVY ^{N:0}	(BHQ1)-GCAAGCCTTGGGAG(FAMdT)AACACGACCA	81	1×10 ²
TRV	(BHQ1)-GAACCGTGGCAGG(FAMdT)GAGAGGAGACAC	82	1×10 ²
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	(BHQ1)-CGCGTCTTTTT(FAMdT)GGGGTGTGGGCA	83	5×10 ²
<i>Dickeya solani</i>	(BHQ1)-CGACGTGAAAATGTGA(FAMdT)GACTTCCATCC	82	5×10 ¹
<i>D. dianthicola</i>	(BHQ1)-TTCGTCTTCTTCGC(FAMdT)TTCGTCTGTCGCA	82	1×10 ¹

Примечание. PVY^{NTN} — Y вирус картофеля (штамм NTN), PVY^{N:0} — Y вирус картофеля (штамм N:0), TRV — вирус погрешности табака; T₀ — расчетная температура отжига зондов.

Другой важный показатель качества работы диагностической системы — ее аналитическая чувствительность, для определения которой использовали 10-кратные разведения плазмид (ПКО) с известными концентрациями и числом копий в реакционной смеси. Наибольшей чувствительностью обладали системы идентификации PVY^{NTN} и *D. dianthicola* (около 10 копий плазмиды с соответствующим клонированным фрагментом ДНК на реакцию), наименее чувствительной из всех была система идентификации *P. atrosepticum* (500 копий на реакцию) (табл. 3).

Диапазон значений эффективности для разработанных тест-систем колебался от 91,2 до 98,0 %. Значения стандартных отклонений при тестировании каждого из 10-кратных разведений в трех повторностях варьировали от 0,09 до 0,53, величина *Sv* не превышала 2 %. На рисунке 1 в качестве примера приведены графики зависимости порогового цикла от числа копий плазмид с клонированными фрагментами ДНК целевых объектов (ПКО) на одну реакцию, а также графики накопления флуоресцентного сигнала на примере тест-систем для PVY^{NTN} и *D. dianthicola*.

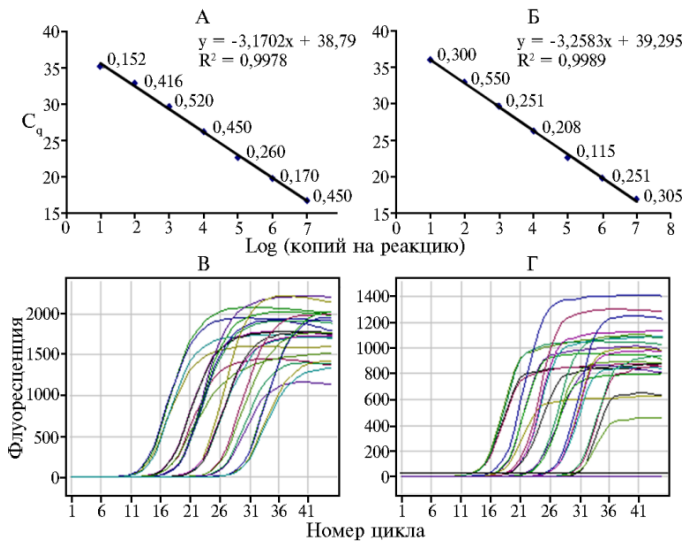


Рис. 1. Оценка чувствительности и эффективности тест-систем, разработанных для идентификации шести некарантинных патогенов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), со специфическими положительными контролями в 10-кратных разведениях: А и Б — зависимость порогового цикла количественной ПЦР от числа копий плазмидной ДНК на реакцию (рядом с каждой точкой показаны значения стандартных отклонений, вычисленные для четырех повторностей), В и Г — соответствующие графики накопления флуоресценции. Чувствительность тест-системы для PVY^{NTN} — 10 копий на реакцию при эффективности 98,0 % (А), для *Dickeya dianthicola* — 10 копий на реакцию при эффективности 96,7 % (Б).

Качество предложенных тест-систем также оценили с использованием клубней картофеля разных сортов, предположительно зараженных анализируемыми патогенами. При постановке ПЦР, помимо специфических праймеров и зондов, в реакционную смесь добавляли плазмиду ВКО, соответствующую пару праймеров и зонд. У всех девяти образцов картофеля на электрофореграммах продуктов ПЦР кДНК/ДНК с парами праймеров, специфичными в отношении PVY^{NTN} и *D. dianthicola*, присутствовала полоса, соответствующая продукту амплификации ВКО, что указывает на отсутствие ингибирования реакции (рис. 2). В свою очередь, отсутствие специфической полосы в пробирках отрицательного контроля свидетельствует об отсутствии контаминации рабочей зоны специфическими ампликонами. Как следует из представленных электрофореграмм, кДНК

вируса PVY^{NTN} присутствовала в образцах №№ 3 (сорт Ред Скарлетт), 4 (сорт Жуковский ранний), 7 (сорт Фаворит III), 8 (сорт Помдор), 9 (сорт Флорис), а ДНК *D. dianthicola* — в образцах №№ 2 (сорт Ред Скарлетт), 3 (сорт Ред Скарлетт), 6 (сорт Романо), 8 (сорт Помдор), 9 (сорт Флорис).

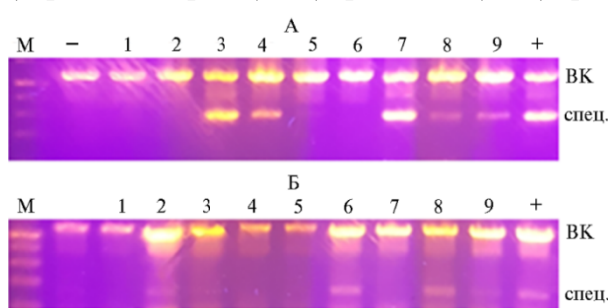


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации (А — κДНК, Б — ДНК) при тестировании клубней картофеля, предположительно зараженных некарантинными патогенами, с парами праймеров Y-NTNF-R (А) и DdiF-R (Б). ВК — внутренний контрольный образец, спец. — специфический продукт амплификации; 1, 2, 3 — сорт Ред Скарлетт, 4 — сорт Жуковский ранний, 5, 6 — сорт Романо, М — маркер молекулярных масс; «-» — отрицательный контрольный образец, «+» — положительный контрольный образец.

частности для определения некротических штаммов PVY^{N:0} и PVY^{NTN} (35), а также основных пектинолитических бактерий, включая *P. atrosepticum* и *Dickeya* spp. (минимальная чувствительность — 0,01 нг/мкл специфической ДНК) (36), однако они не были адаптированы в формат количественной ПЦР. Праймеры, позволяющие специфично различать виды рода *Dickeya*, были описаны в 2013 году (37) и успешно использованы при выявлении патогенов в овощных культурах на территории Северной Ирландии (38). Для такой тест-системы показана очень высокая чувствительность, составившая около 0,05 пг ДНК на реакцию (около 10 копий плазмидной ДНК). Также, описан ряд систем диагностики вируса погрешковости табака разной чувствительности (39-41). В работе R. Holeva с соавт. (42) чувствительность системы составила около 1 фг плазмидной ДНК на реакцию (приблизительно 10² копий).

Таким образом, основные характеристики предложенных тест-систем оказались близки к таковым у наиболее эффективных зарубежных аналогов или даже превосходили их. Чувствительность систем составила от 10 до 500 копий специфической ДНК на реакцию, а эффективность амплификации превышала 90 %. Показана высокая воспроизводимость получаемых результатов (*Cv* не более 2 %, стандартные отклонения по разведениям — не более 0,53). Отмечена высокая степень разгорания специфических зондов, а также оптимизирована система внутреннего контроля. Качество работы тест-систем подтверждено тестами с использованием растительного материала, зараженного исследуемыми патогенами. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что разработанные тест-системы с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицируют шесть некарантинных патогенов картофеля, наносящих существенный экономический ущерб. Эти системы могут стать важным компонентом мониторинга зараженности посадочного материала, растений и пищевой продукции фитопатогенами.

Отметим, что в литературе в настоящее время описаны несколько вариантов тест-систем для идентификации патогенов, изучаемых в настоящей работе. В.К. Швидченко с соавт. (34) показали, что метод ПЦР в реальном времени существенно более специфичен, чем ИФА, при диагностике вирусов картофеля, в том числе PVY (диагностическая чувствительность ИФА относительно ПЦР-РВ — 68 %). Предложен ряд систем в формате мультиплексной ПЦР, в

DEVELOPMENT OF NEW qPCR-BASED IDENTIFICATION SYSTEMS FOR NON-QUARANTINE POTATO (*Solanum tuberosum* L.) PATHOGENS DISTRIBUTED IN THE TERRITORY OF RUSSIA

A.A. Stakheev¹, M.S. Chigareva¹, A.I. Uskov², I.V. Shmyglya², Yu.A. Varitsev²,
P.A. Galushka², S.K. Zavriev¹

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 16/10, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117997 Russia, e-mail stakheev.aa@gmail.com (✉ corresponding author), magyter@yandex.ru, szavriev@ibch.ru;

²Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Farming, 23, ul. Lorkha, pos. Korenevo, Lyubertsy Region, Moscow Province, 140051 Russia, e-mail korenevo2000@mail.ru, i.shmyglya@mail.ru, varyuriy@yandex.ru, pavel_galushka@mail.ru ORCID:

Stakheev A.A. orcid.org/0000-0002-0732-5321

Varitsev Yu.A. orcid.org/0000-0002-2329-7965

Chigareva M.S. orcid.org/0000-0002-2940-5410

Galushka P.A. orcid.org/0000-0003-4680-9684

Uskov A.I. orcid.org/0000-0003-1596-8359

Zavriev S.K. orcid.org/0000-0002-6741-8175

Shmyglya I.V. orcid.org/0000-0002-4727-7141

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The article was prepared as part of the Federal Program for the Development of Agriculture of the Russian Federation for 2017-2025 (Sub-Program "Potato breeding and seed production").

Received October 22, 2019

doi: 10.15389/agrobiology.2020.1.77eng

Abstract

Russia is among the largest potato producers in the world. According to statistics for 2018, the sown area of potatoes amounted to 310.7 thousand ha, which is 3.5 % more than in 2017, and the gross harvest in the industrial sector is 7157 thousand tons. At the same time, potatoes are susceptible to infection by various plant pathogens of different taxonomic groups. In modern potato growing, the progressive spread of viral and bacterial diseases, which, in addition to reducing the yield, causes a catastrophic deterioration of tubers' quality, leads to a serious problem for commercial production. Not all dangerous pathogens belong to quarantine organisms in Russia. However, the need for their accurate and highly specific identification is not less than for quarantine organisms. Currently, classic diagnostic methods in potato growing are indicator plants, serological and cytological tests. They are relatively reliable, but not always sensitive enough, time-consuming and their use requires highly qualified personnel. A modern alternative to these methods are diagnostic systems based on polymerase chain reaction (PCR), in particular, its real-time modification (quantitative PCR, qPCR). In the present study, for the first time in Russia, qPCR-based tests were developed for six non-quarantine pathogens — necrotic strains of potato virus Y (PVY^{N-NTN} and PVY^{N:O}), tobacco rattle virus (TRV), and pathogenic bacteria *Dickeya solani*, *D. dianthicola*, and *Pectobacterium atrosepticum*. Primers and fluorescent-labeled probes were designed based on nucleotide sequences presented in the NCBI GenBank international database for the amplicon size not more than 500 bp. The specificity of the proposed systems was shown in tests with the genetic material of pathogens that infect potatoes, which are taxonomically close or occupy similar ecological niches, such as the ordinary strain PVY, potato mop-top virus, *Pectobacterium carotovorum*, and *D. zea*. The quality of the proposed test systems was also evaluated using plant material, presumably infected with the analyzed pathogens. Nucleic acids were isolated using Proba-NK (for RNA) and Proba-GS (for DNA) reagents (AgroDiagnostica LLC, Russia). For the reverse transcription reaction, the RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) was used. PCR was carried out in the Tertsik amplifier (DNA-technology, Russia), and quantitative PCR was performed in the DT-96 detection amplifier (DNA-technology, Russia). To assess possible inhibition, an internal control sample (IC, a plasmid with a specific 560 bp insert) was added to the reaction mixture. Positive control samples (PCs) were cloned using the Quick-TA kit (Evrogen, Russia). Plasmid DNA concentration was determined (a NanoVue spectrophotometer, GE HealthCare, USA). DNA molecules were sequenced (an ABI PRISM 3730 automated sequencer, Applied Biosys-

tems, USA). Analytical sensitivity was evaluated by quantitative PCR, in which sequential 10-fold dilutions of plasmid DNA (PC in four independent replicates) in the range of 10^7 to 10^0 copies per reaction were used as matrices. High sensitivity of the developed test systems, ranging from 10 to 500 copies of specific DNA per reaction, as well as high reproducibility (C_v 1.5-2.0 %) were shown. The maximum fluorescence increase for the developed hydrolyzed probes ranged from 1200 to 2000 units of background. The universality of the proposed amplification profiles can serve as the basis for adapting test systems to the multiplex PCR format. The obtained results indicate that these systems detect the analyzed pathogens with high specificity and sensitivity and can be used as part of phyto-sanitary control and routine diagnosis of 6 non-quarantine pathogens in plants, planting material and food products.

Keywords: diagnostics, quantitative PCR, sensitivity, specificity, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola*, necrotic strains of potato virus Y, PVY, tobacco rattle virus.

REFERENCES

- Oerke E.-C. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 2006, 144(1): 31-43 (doi: 10.1017/S0021859605005708).
- Malko A., Frantsuzov P., Nikitin M., Statsyuk N., Dzhavakhiya V., Golikov A. Potato pathogens in Russia's regions: an instrumental survey with the use of real-time PCR/RT-PCR in matrix format. *Pathogens*, 2019, 8(1): 18 (doi: 10.3390/pathogens8010018).
- Govorov D.N., Zhiviykh A.V., Novoselov E.S., Golikov A.G. *Zashchita i karantin rastenii*, 2015, 7: 35-37 (in Russ.).
- Shlyakhov V.A., Grigoryan L.N. *Zhivye i biokosnye sistemy*, 2017, 21: 6 (in Russ.).
- GOST 33996-2016. *Kartofel' semennoi. Tekhnicheskie usloviya i metody opredeleniya kachestva* [GOST 33996-2016. Potato seed. Technical conditions and methods for quality estimation]. Moscow, 2017 (in Russ.).
- Gera A., Marco S. Detection and identification of viruses in potatoes. In: *Virus and virus-like diseases of potato and production of seed-potatoes*. G. Loebenstein, P.H. Berger, A.A. Brunt, R.H. Lawson (eds.). Springer, Dordrecht, 2000: 271-283 (doi: 10.1007/978-94-007-0842-6).
- Anisimov B.V., Belov G.L., Varitsev Yu.A., Elanskii S.N., Zhuromskii G.K., Zavriev S.K., Zeiruk V.N., Ivanyuk V.G., Kuznetsova M.A., Plyakhnevich M.P., Pshechenkov K.A., Simakov E.A., Sklyarova N.P., Stashevski Z., Uskov A.I., Yashina I.M. *Zashchita kartofelya ot boleznei, vreditel'ei i sornyakov* [Protecting potatoes from diseases, pests and weeds]. Moscow, 2009 (in Russ.).
- Chrzanowska M. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) found recently in Poland (doi: 10.1007/BF02358039).
- Visser J.C., Bellstedt D.U., Pirie M.D. The recent recombinant evolution of a major crop pathogen potato virus Y. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e50631 (doi: 10.1371/journal.pone.0050631).
- Ribeiro S.R.R.P., Pinto C.A.B.P., Costa S.B.F.G., Menezes M., dos Reis Figueira A.R. Resistance of potato clones to necrotic recombinant strains of potato virus Y (PVY). *Ciência e Agrotecnologia*, 2014, 38(4): 343-351 (doi: 10.1590/S1413-70542014000400004).
- Dougherty W.G., Carrington J.C. Expression and function of polyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology*, 1988, 26: 123-143 (doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.001011).
- Hu X., Karasev A.V., Brown C.J., Lorenzen J.H. Sequence characteristics of potato virus Y recombinants. *Journal of General Virology*, 2009, 90(12): 3033-3041 (doi: 10.1099/vir.0.014142-0).
- Kozyreva N.I., Romanenko N.D. *Parazitologiya*, 2008, 42(5): 428-434 (in Russ.).
- Romanenko N.D., Kozireva N.I. Investigations of trichodorid nematodes (*Nematoda: Trichodoridae*) and tobnaviruses in Russia. *Russian Journal of Nematology*, 1998, 6(1): 77.
- Vlasov Yu.I. *Zakonomernosti razvitiya virusnykh epifitotii* [Patterns of development of viral epiphytotes]. Moscow, 1974 (in Russ.).
- Larina E.I., Teploukhova T.N. *Zashchita rastenii*, 1975, 3: 51 (in Russ.).
- Rogozina E.V., Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Matsukhito Yu. *Vestnik zashchity rastenii*, 2016, 4(90): 24-33 (in Russ.).
- Cooper J.I. The distribution in Scotland of tobacco rattle virus and its nematode vectors in relation to soil type. *Plant Pathology*, 1971, 20(2): 51-58 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1971.tb00510.x).
- Beuch U., Persson P., Edin E., Kvarnheden A. Necrotic diseases caused by viruses in Swedish potato tubers. *Plant Pathology*, 2014, 63(3): 667-674 (doi: 10.1111/ppa.12141).
- Yellareddygarri S.K.R., Brown C.R., Whitworth J.L., Quick R.A., Hamlin L.L., Gudmestad N.C. Assessing potato cultivar sensitivity to tuber necrosis caused by Tobacco rattle virus. *Plant Disease*, 2018, 102(7): 1376-1385 (doi: 10.1094/PDIS-12-17-1918-RE).
- Minson T., Dabby G. 3'-terminal oligonucleotide fragments of tobacco rattle virus ribonucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 1973, 77(2): 337-340 (doi: 10.1016/0022-2836(73)90339-2).
- Crosslin J.M., Hamm P.B., Kirk W.W., Hammond R.W. Complete genomic sequence of a Tobacco rattle virus isolate from Michigan-grown potatoes. *Archives of Virology*, 2010, 155(4): 621-625 (doi: 10.1007/s00705-010-0609-0).

23. Kim Y.J., Lim M.S., Kim S.M., Ryu K.H., Choi S.H. Molecular characterization of the Tobacco rattle virus RNA2 genome isolated from *Gladiolus*. *Acta Biologica Hungarica*, 2015, 66(2): 222-230 (doi: 10.1556/018.66.2015.2.8).
24. Ignatov A.N. *Kartofel' i ovoshchi*, 2011, 5: 28-29 (in Russ.).
25. Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrör (Lakhim) L., Elphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 2011, 60(3): 385-399 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x).
26. Shneider M.M., Kabanova A.P., Korzhenkov A.A., Miroshnikov K.K., Thi N.H.V., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. Draft genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* PB72 and complete genome sequence of the specific bacteriophage PP90. *Genome Announcements*, 2018, 6: e00473-18 (doi: 10.1128/genomeA.00473-18).
27. Khayi S., Blin P., Chong T.M., Robic K., Chan K.-G., Faure D. Complete genome sequences of the plant pathogens *Dickeya solani* RNS 08.23.3.1.A and *Dickeya dianthicola* RNS04.9. *Genome Announcements*, 2018, 6: e01447-17 (doi: 10.1128/genomeA.01447-17).
28. Li X., Ma Y., Liang S., Tian Y., Yin S., Xie S., Xie H. Comparative genomics of 84 *Pectobacterium* genomes reveals the variations related to a pathogenic lifestyle. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 889 (doi: 10.1186/s12864-018-5269-6).
29. Ryazantsev D.Yu., Zavriev S.K. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. *Molecular Biology*, 2009, 43(3): 515-523 (doi: 10.1134/S0026893309030200).
30. Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425 (doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454).
31. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622 (doi: 10.1373/clinchem.2008.112797).
32. Stakheev A.A., Ryazantsev D.Yu., Gagkaeva T.Yu., Zavriev S.K. PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. *Food Control*, 2011, 22(3-4): 462-468 (doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.028).
33. Stakheev A.A., Khairulina D.R., Zavriev S.K. Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 225: 27-37 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.012).
34. Shvidchenko V.K., Khasanov V.T., Fida M.A., Beisembina B., Kharchenko P.N., Alekseev Ya.I., Blagodatskikh K.A., Kazantsev A.S., Minakova N.Yu. *Vestnik Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2014, 2: 47-49 (in Russ.).
35. Nie X., Singh R.R. Specific differentiation of recombinant PVY^{N:0} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2003, 113(2): 69-77 (doi: 10.1016/S0166-0934(03)00221-0).
36. Potrykus M., Sledz W., Golanowska M., Slawiak M., Binek A., Motyka A., Zoledowska S., Czajkowski R., Lojkowska E. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 2014, 165(3): 474-487 (doi: 10.1111/aab.12156).
37. Pritchard L., Humphris S., Saddler G.S., Parkinson N.M., Bertrand V., Elphinstone J.G., Toth I.K. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using PCR primer prediction pipeline for a draft bacterial genome sequences. *Plant Pathology*, 2013, 62(3): 587-596 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02678.x).
38. Zaczek-Moczydłowska M., Fleming C.C., Young G.K., Campbell K., O'Hanlon R. *Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 154(3): 635-647 (doi: 10.1007/s10658-019-01687-1).
39. Mumford R.A., Walsh K., Barker I., Boonham N. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 2000, 90(5): 448-453 (doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.5.448).
40. Xu H., Nie J. Molecular detection and identification of potato isolates of Tobacco rattle virus. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28(2): 271-279 (doi: 10.1080/07060660609507296).
41. Holeva R., Philips M.S., Neilson R., Brown D.J.F., Young V., Boutsika K., Blok V.C. Real-time PCR detection and quantification of vector trichodoriid nematodes and tobacco rattle virus. *Molecular and Cellular Probes*, 2006, 20(3-4): 203-211 (doi: 10.1016/j.mcp.2005.12.004).