

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ФИТОПАТОЛОГИИ

**Басова Д.А., магистрантка 3 курса направления подготовки
«Биология», ФВМиБ, basova_dasha12@mail.ru**

**Лыдина М.А., магистрантка 1 курса направления подготовки
«Биология», ФВМиБ, lydina2016@yandex.ru**

**Научный руководитель – Феоктистова Н.А.,
кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

***Ключевые слова:** ПЦР, метод, ДНК, фитопатоген, праймер, фрагмент, зонд*

Статья посвящена описанию метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ее использованию для целей фитопатологии. Установлено, что ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) - более быстрый и чувствительный метод диагностики фитопатогенов, по сравнению с классическим ПЦР, что разработаны протоколы ПЦР-РВ для анализа генов, специфичных для некоторых видов фитопатогенных бактерий, грибов и вирусов.

Для поиска известных фитопатогенных объектов в пораженном материале или в других пробах широко используют разнообразные тест-системы, созданные, в основном, на основе ПЦР или иммуноферментного анализа. Ограничением использования диагностики молекулярными методами является то обстоятельство, что для многих фитопатогенов пока не создано тест-систем. С другой стороны, даже успешно работающие в Европе или в Америке тест-системы могут не дать желаемого результата при использовании в других странах, например, в России. Особенно это характерно для быстро мутирующих вирусов или бактерий: тест-система может не узнавать некоторые их штаммы, в результате чего мы получаем ложноотрицательный результат. Может быть и обратная ситуация, когда тест-система, разработанная для одного вида, дает

положительные результаты для близкородственных видов, т.е. мы имеем ложноположительные результаты. Последнее особенно неприятно при выявлении карантинных организмов. Поэтому все тест-системы должны проходить обязательную проверку на штаммах из разных регионов и на близкородственных видах [1]. В случае, когда для интересующего вида не существует разработанных и апробированных тест-систем, остается только создавать их самостоятельно. Однако создание тест-систем и их проверка - занятие сложное и длительное, доступное только для хорошо оборудованных научных учреждений с квалифицированным штатом [2]. Как уже было отмечено, метод ПЦР отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, однако количественная оценка продуктов амплификации с помощью обычного ПЦР и его вариантов, особенно, если необходимо измерить исходное содержание ДНК-матрицы в анализируемом образце, является достаточно сложной задачей. Выход продукта, образующегося в процессе полимеразной реакции, зависит не только от количества введенной в пробу ДНК, но и от состава образца. Кроме того, после определенного цикла амплификации накопление ее продукта постепенно замедляется. Таким образом, при детекции продуктов ПЦР после амплификации практически невозможно учесть все факторы, оказывающие влияние на ход реакции и с точностью оценить количество ДНК-мишени [3]. Простым и распространенным, но не слишком надежным способом полуколичественного ПЦР-анализа, является использование внутреннего стандарта, который анализируют одновременно с образцом определяемой ДНК. Внутренними стандартами служат фрагмент ДНК (так называемая конкурентная ДНК-competitor DNA), который, как и фрагмент определяемой ДНК содержит участки отжига праймеров, но при одновременной амплификации дает продукт иного размера, чем целевой ампликон, или фрагменты «генов домашнего хозяйства», для которых используют специфичные к ним праймеры. После проведения несколько реакций с различными разведениями внутреннего стандарта, результаты оценивают с помощью электрофореза или гибридизации с ДНК-зондами [4]. Для более точной количественной оценки разработан подход, позволяющий отслеживать кинетику накопления продуктов амплификации и измерять их количество во время реакции. Этот подход

лежит в основе метода ПЦР в реальном времени. Данный метод дает возможность регистрировать продукты ПЦР непосредственно в ходе реакции и получать калибровочные графики для процесса амплификации, происходящего в каждой отдельной пробирке во время каждого цикла на протяжении всего времени проведения анализа. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) - более быстрый и чувствительный метод диагностики фитопатогенов, по сравнению с классическим ПЦР. Он дает информацию не только о присутствии, но и о количестве патогена в исследуемом образце непосредственно после этапа амплификации и не требует отнимающей дополнительное время стадии электрофоретического разделения продуктов [5]. Специфичность ПЦР-РВ анализа иногда оказывается выше, чем у альтернативных вариантов ПЦР, что позволяет различать последовательности, отличающиеся по одной паре оснований, например, для того, чтобы выявлять устойчивые к фунгицидам штаммы и отличать их от восприимчивых. Разработаны методики ПЦР-РВ, при которых вся процедура проходит в закрытой системе, что предотвращает контаминацию и получение ложноположительных результатов [6]. Для ПЦР-РВ используют флуоресцентные зонды и специальное оборудование. Амплификацию проводят в приборе, снабженном устройством для освещения пробирок светом с длиной волны, возбуждающим флуоресценцию, и многоканальным флуоресцентным детектором, позволяющим измерять уровень флуоресценции в каждой пробирке. Флуоресцентный зонд может быть либо включен в амплифицируемый фрагмент, либо, напротив, освободиться в реакционную смесь в процессе амплификации. Если необходимо анализировать несколько разных ДНК-мишеней, можно использовать зонды, связанные с различными флуоресцентными красителями [7]. В последние годы, ПЦР в реальном времени широко применяют для практических целей в фитопатологии. Ряд книг и обзоров полностью или частично посвящен данному методу и его применению для детекции и идентификации фитопатогенов. Он используется при диагностике болезней растений в полевых условиях, в том числе тех, возбудителями которых, являются наиболее вредоносные и карантинные патогены, особенно когда необходима быстрая и точная их идентификация. Например, вируса пятнистого увядания томата, потивируса сливы, *Ralstonia solanacearum*,

Pseudomonas syringae, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Phytophthora infestans*, *P. citricola*, *Septoria tritici*, *Puccinia recondita*, *P. striiformis*, *Tilletia indica*, *Phomopsis longicola*, *Rhizoctonia solani*. Разработаны протоколы ПЦР в реальном времени для анализа генов, участвующих в токсигенезе у продуцирующих трихотеценовые микотоксины грибов рода *Fusarium* и образующих афлатоксины видов *Aspergillus* [8].

Библиографический список

1. Шварцев, А.А. Разработка праймеров и зондов для диагностики фитопатогенных грибов рода *Fusarium* методом ПЦР в реальном времени / А.А. Шварцев, С.А. Блинова, С.В. Сыксин // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. – 2019. – С. 201-202.
2. Бакулина, А.В. Применение молекулярно-генетического анализа для идентификации фитопатогенных грибов / А.В. Бакулина, И.А. Лундовских // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем. - 2021. - С. 158-162.
3. Разработка праймерной системы и зонда для идентификации *Staphylococcus aureus* методом ПЦР-РВ / Е.В. Сульдина, Н.А. Феоктистова, А.А. Ломакин, А.В. Мастиленко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2022. - № 4 (60). - С. 137-142.
4. Барейко, А.А. ПЦР-диагностика грибов-возбудителей болезней огурца и томата / А.А. Барейко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. - 2019. - С. 200-215.
5. Кокаева, Л.Ю. Актуальность ПЦР-диагностики для идентификации видов фитопатогенных микроорганизмов, их внутривидовых комплексов, а также штаммов, несущих мутации устойчивости к фунгицидам / Л.Ю. Кокаева, И.А. Кутузова, С.Н. Еланский // История и современное состояние научных исследований в Учебно-опытном почвенно-экологическом центре Московского университета «Чашниково». - 2019. - С. 111-112.
6. Подбор праймеров для индикации и идентификации бактерий *Bordetella petrii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме "реального времени" / Н.А. Феоктистова, А.А. Ломакин, А.В.

Мастиленко // Материалы XII международной научно-практической конференции, посвященной 160-летию со дня рождения П.А. Столыпина «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». - Ульяновск, 2022. - С. 316-321.

7. Рязанцев, Д.Ю. Детекция *Colletotrichum coccodes* с помощью ПЦР в реальном времени / Д.Ю. Рязанцев // Микология и фитопатология. - 2020. - Т. 54. - №. 1. - С. 42-48.

8. Кожабергенов, Н.С. Разработка дуплексной тест-системы ПЦР для дифференциальной диагностики септориоза пшеницы / Н.С. Кожабергенов // Вестник КазНУ. Серия экологическая. - 2020. - Т. 63. - №. 2. - С. 63-70.

USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR PHYTOPATHOLOGY

Basova D.A., Lydina M.A.

Keywords: *PCR, method, DNA, phytopathogen, primer, fragment, probe*

The article is devoted to the description of the polymerase chain reaction (PCR) method and its use for phytopathology. It was established that real-time PCR (PCR-RV) is a faster and more sensitive method for diagnosing phytopathogens compared to classical PCR, which developed PCR-RV protocols for analyzing genes specific for some types of phytopathogenic bacteria, fungi and viruses.