

ЗОЛОТИСТАЯ КАРТОФЕЛЬНАЯ НЕМАТОДА В КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ РЕСПУБЛИКЕ. МЕТОДЫ СОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ

Велегуров Артем Сергеевич, ведущий агроном ИЛ
Всероссийский центр карантина растений, Пятигорск, Россия
e-mail: as.velegurov@omgau.org

Барайщук Галина Васильевна, доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры садоводства, лесного хозяйства и защиты растений
Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, Россия
e-mail: gv.barayschuk@omgau.org

Аннотация. В современном мире активно идет развитие диагностических лабораторий и научно-исследовательских институтов, занимающихся идентификацией вредных организмов и обеспечивающих карантинную фитосанитарную безопасность страны. Создаются и внедряются новые технологии, основанные на ДНК-анализе. Применение современных методов стало возможным и в практической деятельности. Положительными сторонами данного метода стали универсальность, высокая чувствительность и относительная простота использования ПЦР-диагностики. Незаменимым качеством при идентификации золотистой картофельной нематоды, стало и то, что этот метод более продуктивный, и занимает более короткий промежуток времени, для определения видовой принадлежности. Результативность и качество выполнения диагностического подтверждения принадлежности составляет 99.9%

Ключевые слова: ЗКН, картофель, вред, микроскопические черви, лабораторная диагностика, ПЦР-метод, праймер, зонд, участок, амплификация.

GOLDEN POTATO NEMATODA IN THE KARACHAYOV-CHERKESS REPUBLIC. MODERN DIAGNOSTIC METHODS

Velegurov Artem Sergeevich, leading agronomist
All-Russian Center for Plant Quarantine, Pyatigorsk, Russia
e-mail: as.velegurov@omgau.org

Baraishchuk Galina Vasilievna, doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Horticulture, Forestry and Plant Protection
Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia
e-mail: gv.barayschuk@omgau.org

Abstract. In recent years, there has been an active development of diagnostic laboratories and research institutes dealing with the identification of pests and ensuring the quarantine phytosanitary safety of the country. New technologies based on DNA analysis are being created and introduced. The use of modern methods has become possible in practice as well. The advantages of this method are the versatility, high sensitivity and relative ease of use of PCR diagnostics. An indispensable quality in the identification of the golden potato nematode is that this method is more productive and takes a shorter period of time to determine the species. The effectiveness and quality of the diagnostic confirmation of belonging is 99.9%

Keywords: SCI, potatoes, harm, microscopic worms, laboratory diagnostics, PCR method, primer, probe, site, amplification.

В современном мире в лабораториях по определению видовой принадлежности вредных организмов, которые являются вредоносными, как для Европы, так и для России стали активно применять молекулярную диагностику. Российские и зарубежные специалисты и ученые, работающие по карантинным объектам и организмам нуждаются в современной экспресс-диагностике. В основной своей степени это касается карантинных и некарантинных видов, идентификация которых весьма трудоёмка и требующая многолетнего опыта и высокой компетенции специалиста. К таким видам вредных организмов относится и золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis*) – паразит растений — имеющий вид микроскопических червей, которые поражают пасленовые культуры, но в основном это картофель [2, с.128-130]. Поврежденный картофеля растёт очень медленно, снизу листья усыхают и опадают. На посадках картофеля

формируются проплешины, на данных растениях формируются мелкие клубни, либо отсутствуют вовсе. При этом в таком картофеле снижается процент содержания питательных веществ. По многим литературным источникам потери урожая колеблются от 15 до 80 %. Выращивание пасленовых культур как монокультуру, т.е. на одном и том же участке без ежегодной смены участка, приводит к ежегодному увеличению численности цистообразующего паразита в почве [2, с. 128-130]. Распространение вредителя началось с южной части Америки. В Германии впервые была обнаружена в 1913 году, где её развитие продолжилось по всем континентам и в различных климатических зонах. Личинки самок цистообразующей нематоды обладают способностью, при отсутствии растения-хозяина впадать в состояние анабиоза до 10 лет. В 1980 году в Ставропольском крае впервые были выявлены очаги в Карачаево-Черкесской Республике, была подтверждена видовая принадлежность к цистообразующей картофельной нематоды *Globodera rostochiensis*. Анализируя результаты обследовательских мероприятий специалистами по карантину растений, с 1980 года можно подтвердить факт увеличения отобранных образцов с участков, это связано в первую очередь с проведением мероприятий по контролю за вредными объектами (табл. 1).

Таблица 1 – Динамика отбора почвенных образцов по годам

Район обследования	Количество отобранных почвенных образцов, шт			
	1980 год	1981 год	1982 год	1983 год
Карачаево-Черкесская Республика (Зеленчукский р-н, станица Сторожевая)	675	1064	2073	2644

В специализированных лабораториях по карантину растений занимаются определением видовой принадлежности ЗКН по морфологическим и морфо-метрическим показателям. Эта процедура очень трудоемка, в связи с этим был внедрен метод, на основе полимеразной цепной реакции – как перспективный метод диагностики не только вредных организмов, но и не карантинных видов, представляющих научный интерес.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – это процесс копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК проходимой многократно. При диагностике на подтверждение видовой состава организма в продовольственном и семенном картофеле возникает необходимость более ускоренной диагностики, так называемой диагностики в режиме реального времени (*real-time pest identification*) [4, с. 21-34]. Одним из важных преимуществ ПЦР-анализа является скорость и высокая специфичность метода [3, с. 7].

На сегодняшний день в лабораторных центрах и научно-исследовательских институтах, занимающихся установлением карантинных фитосанитарных мер, по безопасному использованию продукции широко применяют ПЦР-анализ в формате «*real-time*». Еще до недавнего времени в диагностическом протоколе применяли формат «FLASH». Данный метод обладал рядом преимуществ и недостатков. Из преимуществ можно отнести такие как быстрота выполнения исследования, подготовку к проведению исследований, и высокую чувствительность и специфичность по определению видовой принадлежности. Из отрицательных сторон данного формата явилось только конечный результат при амплификации. Когда как в формате «*real-time*», при определении объекта в амплификаторе, уже на начальных этапах выстраивается график, по которому можно предположить видовую принадлежность к тому или близко родственному организму. В почвенных образцах, выделяем цисты нематод. После чего проводим подготовку проб и выделяем из полученных цист личинок, после чего проводим ПЦР-анализ [4, с. 25-32]. Используем подготовку реакционной смеси комплектом реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Glonodera rostochiensis*, который [5, с. 17-22]. Принцип работы метода в формате «*real-time*» заключается в следующем: в пробирку с реакционной смесью, добавляют анализируемую ДНК и пробирки с положительным контролем. В процессе ПЦР-анализа в тех пробирках, где есть ДНК интересующего нас организма, схожих с контрольным образцов, мы получаем положительные графики [5, с. 20-25].

При лабораторных исследованиях ПЦР-методом выявлены преимущества: Во-первых для ПЦР-теста достаточно выделить ДНК лишь из одной микроскопической особи. Во-вторых можно использовать любую стадию развития нематоды.

В испытательной лаборатории Пятигорского филиала ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» открыта лаборатория, активно занимающаяся ПЦР диагностикой, где реализуются самые

инновационные проекты по использованию современного оборудования, не только в производственных целях, но и в научных. До недавнего времени идентификация по видовой принадлежности проводили по морфо-метрическим показателям. Определяли жизнеспособность по самкам и самцам. По результатам диагностических протоколов, полученных после завершения амплификации, была подтверждена видовая принадлежность *Glonodera rostochiensis*. В 1980 году было проанализировано 675 почвенных образцов, в двух районах станица Зеленчукская и станица Сторожевая выделено 20 цист нематод с жизнеспособными личинками, на площади в 1,05 га. В 2021 году проанализировано 39 почвенных образцов, с тех участков, где были выявлены очаги. По результатам мониторинга были обнаружены цисты в 5 образцах, содержали цисты в количестве 25 штук золотистой картофельной нематоды. Общая площадь зараженных участков составила 0,6 га. Степень зараженности участков под выращиванием картофеля средняя. Анализируя статистические и лабораторные данные по обнаружению паразита приходим к выводу, что площадь очагов по ЗКН идет к снижению, это связано с уменьшением площади посадок картофеля, но в тоже время идет тенденция к увеличению обнаружения цист *Glonodera rostochiensis* в почвенных образцах. Это напрямую связано с применением из года в год одних и тех же сортов картофеля, нарушение агротехнических приемов обработки почвы орудием труда, несоблюдение культурооборота.

По результатам полевого мониторинга и лабораторной диагностики, пришли к выводу, что площади заселенных участков данным видом паразита растет в прогрессии, а степень зараженности районов Карачаево-Черкесской Республики увеличивается. Необходим целый ряд мероприятий по защите и эффективном подавлении паразита.

На сегодняшний день разработка и внедрение новых методов и схем по защите растений от – это приоритетная задача карантинной службы и научно-исследовательских институтов, практикующих установление фитосанитарной безопасности. Научные направления должны быть связаны с естественными механизмами защиты растений, в основе которых находятся исследования по взаимоотношениям нематод с другими организмами – насекомыми, грибами, бактериями. Такие теоретические, а главное практические исследования приведут к появлению принципиально новых, методов защиты растений.

Список литературы

1. Барайщук Г.В. Биологическая защита растений: /Учебное пособие с грифом УМО по агрономическому образованию /Г.В. Барайщук - Омск: изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2006. –142 с.
2. Велегуров А.С., Барайщук Г.В., Шильд М.А. /Полимеразная цепная реакция в идентификации золотистой картофельной нематоды. / Материалы Всероссийской научно-практической конференции. 2019 Издательство: Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I (Воронеж)
3. Деккер Х. Нематоды растений и борьба с ними /Пер. с нем. Л.А. Гуськовой и др. – М.: Колос, 1972. – 444 с.
4. Использование ПЦР-диагностики для идентификации карантинных видов нематод [электронный ресурс] / О.А. Кулинич, А.Ю. Рысс, А.Ю. Чернецкая, В.Л. Пономарев, Д.Ю. Рязанцев, С.К. Завриев // Журнал защита и карантин растений (2015г).- https://iupr.ru/oformlenie_ssylok_na_elektronnye_resursy_setevye_izdaniya/ (дата обращения: 30.11.2018)
5. Прикладная нематология / Н.Н. Буторина, С.В. Зиновьева, О.А. Кулинич и др.; Ин-т паразитологии РАН. – М.: Наука, 2006. –350 с.
6. СТО ВНИИКР 6.001-2010 Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera Rostochiensis* (woll.) Behrens и *Globodera Pallida* (Stone) Behrens Методы выявления и идентификации – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2010. – 34 с.