

УДК 634.10:632.38:58.083

DOI 10.30679/2587-9847-2022-35-64-66

## РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ В ВЕСЕННЕ-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД В ХОДЕ ДИАГНОСТИКИ ACLSV МЕТОДОМ ПЦР

Божидай Т.Н., канд. биол. наук,

Республиканское научно-производственное дочернее унитарное предприятие  
«Институт плодоводства» (Самохваловичи, Беларусь)

**Реферат.** Приведены результаты использования различных органов (почки, побеги, листья, цветки) растений яблони в весенне-летний период в ходе диагностики вируса хлоротической пятнистости яблони (ACLSV) методом ПЦР.

**Ключевые слова:** яблоня, почки, побеги, листья, цветки, ACLSV, РНК, ПЦР

**Summary.** The results of using buds, shoots, leaves, flowers of apple plants in the spring and summer during the diagnosis of apple chlorotic spot virus (ACLSV) by PCR are presented.

**Key words:** apple, buds, shoots, leaves, flowers, ACLSV, RNA, PCR

**Введение.** Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV) является причиной появления круговых, мозаичных узоров как на листьях яблони, так и на листьях других семечковых и косточковых плодовых культур. Для большинства коммерческих сортов яблони вирус не проявляется внешне. Однако на некоторых сортах и культурах отмечены следующие симптомы: прозрачные или хлоротические пятна с ассиметричным нарушением формы листа, линейные узоры на листьях уменьшенного размера, суховершинность, некроз коры [1, 2].

ACLSV переносится при вегетативном размножении, в том числе прививкой, а также нематодами, не распространяется с семенами. Из плодовых и ягодных растений наибольшее распространение вирус получил у яблони, груши, айвы, сливы, вишни и персика [1, 2].

После заражения растения, распространение вируса по органам и тканям и его накопление в растении происходит крайне неравномерно, что приводит к ложноотрицательным результатам при диагностике и, как следствие, дальнейшему распространению вирусов в насаждениях.

Контроль фитосанитарного состояния растений является также ключевым элементом технологической цепочки получения высококачественного посадочного материала, соответствующего нормативным документам Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO) [1, 3].

Привлечение современных методов диагностики позволяет установить фитосанитарный статус растений в насаждениях, своевременно выбраковать больные растения. Одним из таких методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая позволяет быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью определять наличие анализируемого вируса даже при латентной инфекции и низком содержании в образце [4, 5].

Цель исследования – оценить результативность использования различных органов растений яблони в весенне-летний период в ходе диагностики вируса хлоротической пятнистости яблони (ACLSV) методом ПЦР в реальном времени.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородия» в рамках задания 1.6 «Разработка экологически безопасных методов и технологий поддержания фитосанитарной стабильности агроэкосистем» подпрограммы «Плодородие и защита растений» Государственной программы научных исследований «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность» (2021–2025 гг.).

Объекты исследований: вирус хлоротической пятнистости яблони (ACLSV); деревья яблони сортов Аксамит, Белана, Антоновка.

Отбор образцов проводили в период начала вегетации (апрель – начало мая) и в период активной вегетации (июнь, июль) с деревьев яблони, зараженных ACLSV. В качестве образцов использовали: в апреле – почки и ткани одревесневших побегов; в мае – листья и цветки; в июне – листья, плоды, однолетние и одревесневшие побеги; в июле – листья и однолетние побеги.

РНК выделяли коммерческим набором реактивов GeneJET Plant RNA Purification Kit (Termo Scientific, Литва), используя 100 мг растительного материала. Измерение концентрации РНК в полученном растворе проводили с помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Implen, Германия).

Выделенную РНК использовали для полимеразной цепной реакции в реальном времени с праймерами и зондом:

- CLs51 – GTTCCTGGCCGCAGAAGGCAGACCCCT;
- CLas137 – GCTATGTTTCGCGAAGATGGACTCC;
- CLp80 – FAM- ATGGAAGGACAGGGGCAATCCTGG -BHQ-1 [5].

Аmplификацию проводили с использованием реагентов ArtMix-RT (АртБиоТех, Беларусь) и амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США).

Условия проведения амплификации: начальная денатурация при 52 °С в течение 35 мин; 95 °С в течение 2 мин; 45 циклов при 95 °С в течение 10 с, 60 °С в течение 1 мин.

**Обсуждение результатов.** В результате тестирования в первой декаде апреля на наличие ACLSV при использовании в качестве растительных проб одревесневшие побеги вирус был диагностирован у всех сортов. У сорта Белана данный вирус был диагностирован также и в почках. Значения пороговых циклов флуоресценции (Cq) составили от 26,98 до 35,09.

В мае при использовании в качестве растительных проб листьев и цветков ACLSV был диагностирован у всех сортов при значениях циклов в пределах 20,64–26,60 (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты тестирования на наличие ACLSV образцов яблони методом ПЦР

Сорт	Наличие вируса			
	первая декада апреля		первая декада мая	
	почка	одревесневший побег	лист	цветок
Аksamит	–	+	+	+
Белана	+	+	+	+
Антоновка	–	+	+	+

В результате тестирования в июне и июле ACLSV был диагностирован у всех сортов во всех изучаемых образцах, за исключением плода сорта Белана. Значения пороговых циклов флуоресценции составили от 22,54 до 32,25 (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты тестирования на наличие ACLSV образцов яблони методом ПЦР

Сорт	Образец	Наличие вируса	
		июнь	июль
Аксамит	лист	+	+
	однолетний побег	+	+
	одревесневший побег	+	н/т
	плод	+	н/т
Белана	лист	+	+
	однолетний побег	+	+
	одревесневший побег	+	н/т
	плод	–	н/т
Антоновка	лист	+	+
	однолетний побег	+	+
	одревесневший побег	+	н/т
	плод	+	н/т

Примечание: н/т – не тестировалось

Отрицательные контроли в опытах не давали показаний С<sub>q</sub>.

**Выводы.** В растениях яблони ACLSV можно диагностировать методом ПЦР уже в начале вегетации как в одревесневших побегах в первой декаде апреля, так и в листьях и цветках в первой декаде мая. В период активной вегетации вирус можно диагностировать как в листьях, так и в побегах.

### Литература

1. Кухарчик Н.В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси. Минск: Беларус. навука, 2012. 209 с.
2. Barba M., Pardi V., Pasquini G. Control of pome and stone fruit virus diseases // *Advances in Virus Research*. 2015. Vol. 91. P. 7-83.
3. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. EPPO Standards PM 4/27 // *Bulletin OEPP/EPPO*. 1999. Vol. 29. P. 239-252.
4. Mirmajlessi S.M., Loit E., Mänd M., Mansouripour S.M. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis – a review // *Plant Protection Science*. 2015. Vol. 51. P. 177-190.
5. Nickel O., Fajardo T.V.M. Detection of viruses in apples and pears by real time RT-PCR using 5'-hydrolysis probes // *Journal of Plant Pathology*. 2014. Vol. 96, № 1. P. 207-213.