

невозможным: Ю.Ю. Кулаковой (начальник НМО инвазивных видов растений), Я.Н. Коваленко (ст. н. с. НМО энтомологии), И.О. Камаеву (ст. н. с. НМО энтомологии), П.А. Яковлеву (ст. н. с. отдела обеззараживания), Е.А. Худяковой (заведующий лабораторией гельминтологии), М.Б. Копиной (начальник НМО микологии и гельминтологии), О.В. Скрипке (вед. н. с. НМО микологии и гельминтологии), Т.А. Суриной (старший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики), Е.Ю. Шнейдер (ст. н. с. НМО вирусологии и бактериологии), Ю.Н. Приходько (вед. н. с. НМО вирусологии и бактериологии), Д.Л. Белкину (заместитель начальника ИЭЦ), И.К. Шахраманову (начальник научно-редакционного отдела).

ЛИТЕРАТУРА

1. Автоматизированная система доступа к данным таможенной статистики внешней торговли «Доступ-ТСВТ» (АСД «Доступ-ТСВТ»). – URL: <http://stat.customs.ru>.  
2. Международная конвенция по карантину и защите растений (новый пересмотренный текст, принятый на 29-й сессии Конференции ФАО, ноябрь 1997 года).  
3. Паспорт национального проекта (программы) «Международная кооперация и экспорт» (утв. президиумом Совета при Президенте РФ по стратегическому развитию и национальным проектам, протокол от 24.12.2018 № 16).  
4. Россельхознадзор: Ввоз. Вывоз. Транзит. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/importExport>.  
5. Countries – International Plant Protection Convention. – URL: <https://www.ippc.int/en/countries>.

the Entomological Research and Methodology Department), P.A. Yakovlev (Senior Researcher of the Fumigation Department), E.A. Khudyakova (Head of the Helminthology Laboratory), M.B. Kopina (Head of the Research and Methodology Department for Mycology and Helminthology), O.V. Skripka (Leading Researcher of the Research and Methodology Department for Mycology and Helminthology), T.A. Surina (Senior Researcher of the Research Department for Molecular Genetic Methods of Diagnosis), E.Y. Schneyder (Senior Researcher of the Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology), Y.N. Prikhodko (Leading Researcher of the Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology), D.L. Belkin (Deputy Head of the Testing Laboratory Center), I.K. Shakhramanov (Head of the Scientific and Editorial Department).

REFERENCES

1 Automated system for access to customs data of foreign trade statistics “Access-TSVT” (ASD “Access-TSVT”). URL: <http://stat.customs.ru> (in Russian).  
2. International Plant Protection Convention (new revised text adopted at the 29th session of the FAO Conference, November 1997) (in Russian).  
3. Passport of the National Project (program) “International Cooperation and Export” (approved by the Presidium of the Presidential Council for Strategic Development and National Projects, Minutes No. 16 dated 12.24.2018) (in Russian).  
4. Rosselkhoznadzor: Import. Export. Transit. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/importExport> (in Russian).  
5. Countries – International Plant Protection Convention. URL: <https://www.ippc.int/en/countries>.

УДК 632.4.01/.08

Идентификация грибов рода *Monilinia* при фитосанитарной диагностике

Д.И. ШУХИН, младший научный сотрудник лаборатории микологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»,  
e-mail: [dmitriq.shukhin@gmail.com](mailto:dmitriq.shukhin@gmail.com)

**Аннотация.** В статье приведены традиционные, а также современные методы идентификации возбудителей монилиозов плодовых культур – грибов рода *Monilinia*, используемые при фитосанитарной диагностике, такие как классическая ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также мультиплексная ПЦР. Описан новый метод масс-спектрометрии MALDI-ToF MS, а также методы выявления патогенов при латентной инфекции.

**Ключевые слова.** Монилиоз, *Monilinia*, бурая монилиозная гниль, идентификация, карантинный объект, ПЦР, MALDI-ToF MS.



ВВЕДЕНИЕ

рибы рода *Monilinia* – опасные патогены плодовых культур. Наиболее экономически значимые представители рода – *M. fructicola* (Winter) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *M. fructigena* (Pers.) Honey. Из них наиболее опасным считается *M. fructicola* – карантинный для Евразийского экономического союза (ЕАЭС) объект [2]. Данный вид проник в Европу из Северной Америки, где также является вредоносным видом. Круг растений – хозяев патогенов достаточно широк – большинство плодовых деревьев семейства Розовые (Rosaceae), однако вредоносность видов различна на разных культурах. Так, *M. laxa* и *M. fructicola* поражают в основном косточковые культуры – растения рода Слива (*Prunus*), такие как персик (*Prunus persica*), слива (*Prunus domestica*), абрикос (*Prunus armeniaca*), вишня (*Prunus cerasus*), черешня (*Prunus avium*), нектарин (*Prunus persica* var. *nucipersica*), алыча (*Prunus cerasifera*). *M. fructigena* наиболее вредоносна на семечковых культурах, таких как яблоня (*Malus domestica*) и груша (*Pyrus communis*) [8].

Особенностью *M. fructicola* является продолжительный период латентной инфекции, когда на растении и плодах отсутствуют видимые симптомы поражения.

Данный вид представляет большую опасность для плодовых насаждений на территории

UDC 632.4.01/.08

Identification of fungi of genus *Monilinia* during phytosanitary diagnosis

D.I. SHUKHIN, Junior Researcher of the Mycology Laboratory of Laboratory Testing Center of FGBU “VNIKR”, e-mail: [dmitriq.shukhin@gmail.com](mailto:dmitriq.shukhin@gmail.com)

**Abstract.** The article presents traditional, as well as modern techniques of identification of fruit crop moniliosis – fungi of the genus *Monilinia* – used in phytosanitary diagnosis, such as conventional PCR, qPCR, and multiplex PCR. The new MALDI-ToF MS mass spectrometry technique is described, as well as techniques of latent pathogen infection detection.

**Keywords.** Moniliosis, *Monilinia*, brown rot, identification, quarantine object, PCR, MALDI-ToF MS.

INTRODUCTION

Fungi of genus *Monilinia* are dangerous pathogens of fruit crops. The most economically important representatives of the genus are *M. fructicola* (Winter) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *M. fructigena* (Pers.) Honey. The most dangerous of them is considered to be *M. fructicola*, a quarantine object for the Eurasian Economic Union (EAEU) [2]. This species has entered into Europe from North America, where it is also a harm species. The host plant range of pathogens is wide enough – the majority of fruit trees of the Rosaceae family, but the harmfulness of species differs on various cultures. Thus, *M. laxa* and *M. fructicola* mainly affect stone fruits – plants of the genus *Prunus*, such as peach (*Prunus persica*), plum (*Prunus domestica*), apricot (*Prunus armeniaca*), sour cherry (*Prunus cerasus*), cherry (*Prunus avium*), nectarine (*Prunus persica* var. *nucipersica*), cherry plum (*Prunus cerasifera*). *M. fructigena* is the most harmful to pome fruits, such as apple (*Malus domestica*) and pear (*Pyrus communis*) [8].

The peculiarity of *M. fructicola* is a long period of latent infection, when there are no visible symptoms of lesions on the plant and fruit.



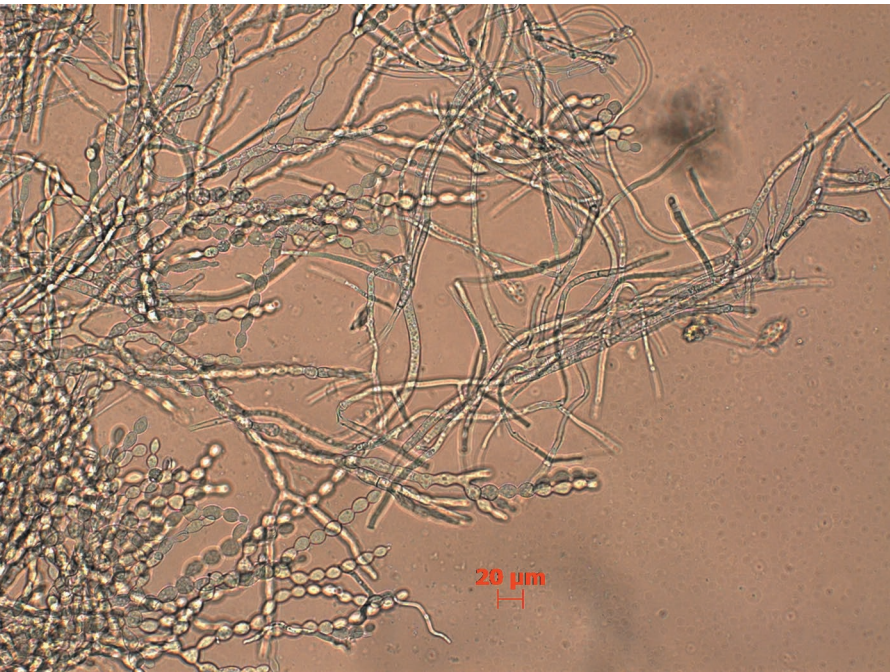


Рис. 1. Конидии *Monilinia* sp. (фото Д.И. Шухина)
 Fig. 1. Conidia of *Monilinia* sp. (photo by D.I. Shukhin)

Российской Федерации, поэтому раннее обнаружение гриба является важнейшей задачей при фитосанитарной диагностике.

ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Традиционным методом при микологических исследованиях является метод влажной камеры. Суть метода заключается в создании оптимальных условий влажности и температуры для гриба в чашке Петри. Части растений стерилизуют, промывают и помещают на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри и инкубируют в термостате 5 суток при 23–25 °C [2]. При появлении характерного серого или бурого мицелия гриба проводят микроскопирование образца. Данный метод достаточно прост в исполнении, экономически приемлем и надежен при идентификации до ранга рода, при этом идентификация до вида требует высокой квалификации специалиста и не является надежной, поскольку грибы рода *Monilinia* имеют сходные морфологические признаки (рис. 1).

Для более точной идентификации грибов рода *Monilinia* применяется культурально-морфологический метод с использованием синоптического ключа Лейна [10]. Данный метод позволяет различать виды между собой, исходя из культуральных признаков. Для этого кусочек 4-дневной колонии гриба, выращенной на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 22 °C в темноте, помещают на агаризованную питательную среду (КГА) в трехкратной повторности, а затем инкубируют при 22 °C в течение 10 дней в условиях 12-часового цикла освещения. Затем проводят идентификацию, исходя из 7 характеристик колонии:

- 1) цвет колонии: серый (А), желтый (В), кремово-белый (С);
- 2) средний диаметр колонии: >80 мм – быстрый рост (D); 70–80 мм – средний рост (Е); <70 мм – медленный рост (F);

This species is very dangerous for fruit plantations in the Russian Federation, therefore, early detection of the fungus is the most important task in phytosanitary diagnosis.

TRADITIONAL IDENTIFICATION TECHNIQUES

The traditional technique in mycological studies is the wet chamber. The essence of the technique is to create optimal humidity and temperature conditions for the fungus in a Petri dish. Parts of plants are sterilized, washed and placed on moistened filter paper in Petri dishes and incubated in a thermostat for 5 days at 23–25 °C [2]. When the characteristic grey or brown mycelium of the fungus appears, the sample is microscopied. This technique is simple enough, affordable and reliable for identification to genus level, thus identification to species level

requires high qualification of a specialist and is not reliable, because fungi of genus *Monilinia* have similar morphological characteristics (Fig. 1).

For more precise identification of fungi of the genus *Monilinia*, a cultural and morphological technique with the Lane’s synoptic key is used [10]. This technique makes it possible to distinguish species from each other based on their cultural characteristics. For this purpose, a piece of a 4-day fungi colony grown on potato dextrose agar (PDA) at 22 °C in the dark, is placed on agarized nutrient medium (PDA) in a triple repetition, and then incubated at 22 °C for 10 days in a 12-hour lighting cycle. Then identification is made based on 7 characteristics of the colony:

- 1) color of the colony: grey (A), yellow (B), cream-white (C),
- 2) average diameter of the colony: >80 mm – rapid growth (D); 70–80 mm – average growth (E); <70 mm – slow growth (F),
- 3) sporulation: abundant sporulation (G), poor sporulation (H),
- 4) concentric sporulation circles: present (I), absent (J),
- 5) colony margin (viewed from the bottom of the dish): lobed margin is visible (K), margin is not lobed (L),
- 6) rosette (on top of the colony): mycelium has clear lobes (or petals) similar to open rose petals (M), none (N),
- (7) dark arcs (from the bottom of the colony): dark arcs or rings similar to rosette isolate (O), dark point zones or brown arcs or rings (P), no arcs or rings are visible (Q).

The resulting letters of the key make up a complex of characteristics of the species:

*M. fruticola*: A, D, (E), G, I, (J), L, (M), N, (P), Q.

- 3) споруляция: обильное спороношение (G), скудное спороношение (H);
  - 4) концентрические круги споруляции: присутствуют (I), отсутствуют (J);
  - 5) край колонии (просматривают с нижней стороны чашки): виден лопастной край (K), край не лопастной (L);
  - 6) розеточность (на верхней стороне колонии): мицелий имеет четкие лопасти (или лепестки), похожие на раскрытые лепестки розы (M), такого нет (N);
  - 7) темные дуги (с нижней стороны колонии): видны темные дуги или кольца, похожие на лепестки розеточного изолята (O), темные точечные зоны либо коричневые дуги или кольца (P), отсутствие дуг или колец (Q).
- Полученные буквы ключа составляют комплекс признаков вида:
- M. fruticola*: A, D, (E), G, I, (J), L, (M), N, (P), Q.
- M. laxa*: A, (C), (E), F, H, J, K, M, (N), O.
- M. fructigena*: B, (C), (D), E, (F), (G), H, (I), J, L, N, Q.
- Фотографии культур грибов рода *Monilinia* представлены на рис. 2.

Стоит отметить, что виды рода *Monilinia* могут сильно варьировать в зависимости от штамма, исходного субстрата, поэтому данные признаки не дают стопроцентно точной идентификации.

*M. laxa*: A, (C), (E), F, H, J, K, M, (N), O.  
*M. fructigena*: B, (C), (D), E, (F), (G), H, (I), J, L, N, Q.

Photos of *Monilinia* fungal cultures are on Fig. 2.  
 It should be noted that species of the genus *Monilinia* can vary greatly depending on the strain, the initial substrate, so these characteristics do not provide 100% accurate identification.

MODERN IDENTIFICATION TECHNIQUES

Currently, the most accurate techniques for identification of fungi of the genus *Monilinia* are molecular ones. The molecular techniques include conventional PCR with universal primers followed by sequencing, conventional PCR with specific primers, multiplex PCR as well as qPCR.

Conventional PCR with universal primers is based on detection of nucleotide sequence of the internal transcribed spectator (ITS) site. For this purpose, DNA is extracted from pure fungal culture and then PCR with universal primers ITS5 (5’-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3’) and ITS4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) is carried out [13].

After amplification electrophoresis is performed (Fig. 3), then samples are cleaned and sequenced. The obtained sequences are compared with reference sequences from GenBank NCBI, MycoBank or another

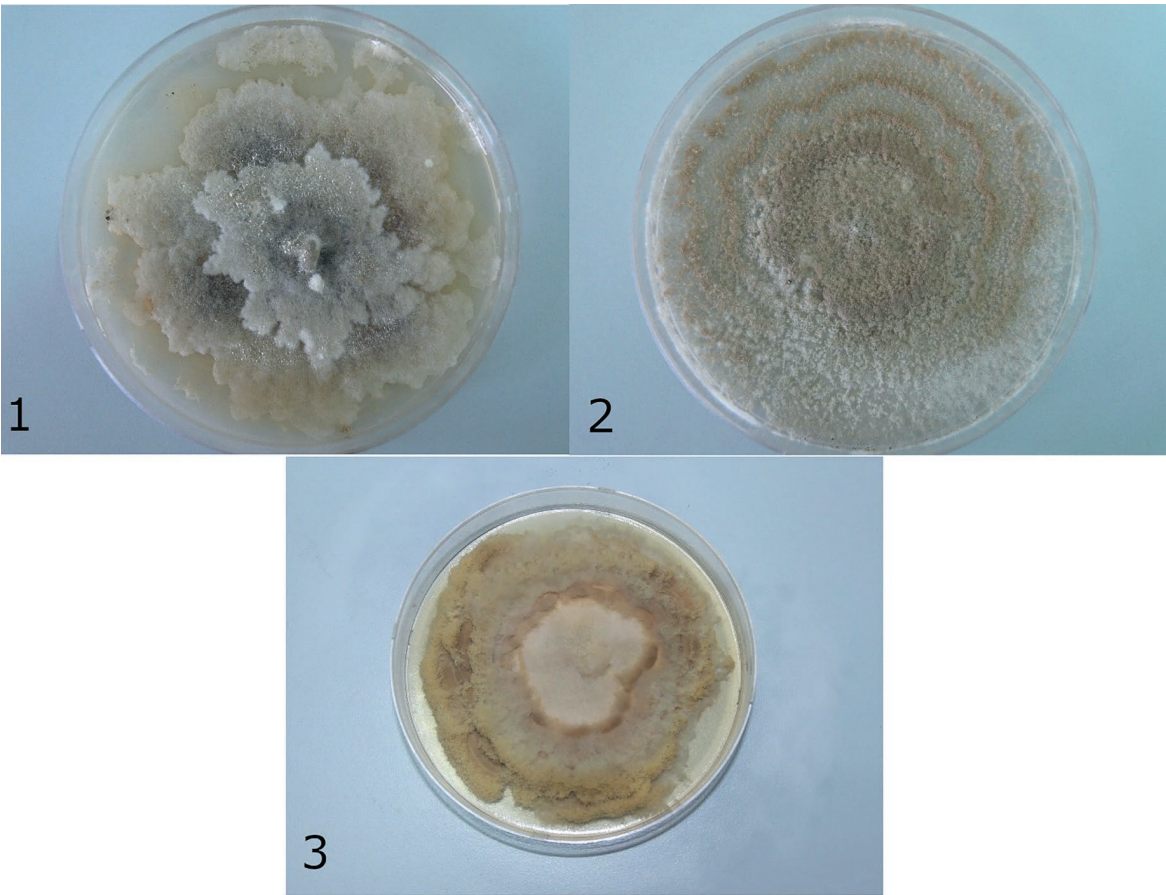


Рис. 2. Колонии грибов рода *Monilinia* на 2%-м КГА: 1 – *M. laxa*, 2 – *M. fruticola*, 3 – *M. fructigena* (фото Д.И. Шухина)

Fig. 2. *Monilinia* fungi colony grown on 2% PDA: 1 – *M. laxa*, 2 – *M. fruticola*, 3 – *M. fructigena* (photo by D.I. Shukhin)



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

В настоящее время наиболее точной является идентификация грибов рода *Monilinia* с помощью молекулярных методов. Из молекулярных методов выделяются метод классической ПЦР с универсальными праймерами с последующим секвенированием, метод классической ПЦР со специфичными праймерами, мультиплексная ПЦР, а также метод ПЦР в реальном времени.

Метод классической ПЦР с универсальными праймерами основан на определении нуклеотидной последовательности участка внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS). Для этого из чистой культуры гриба выделяют ДНК, а затем проводят ПЦР с универсальными праймерами ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [13].

После амплификации проводят электрофорез (рис. 3), затем очистку образцов и секвенирование. Полученные последовательности сравнивают с эталонными последовательностями из GenBank NCBI, MусoBank или другой базы данных. При достаточно высокой точности метода, следует отметить продолжительное время исследования, поскольку для метода подходит только чистая культура гриба (для выращивания колонии необходимо минимум трое суток).

Метод классической ПЦР с использованием специфичных праймеров основан на амплификации участка ITS, специфичного только для одного вида. Для идентификации *M. fruticola*, *M. laxa* и *M. fructigena* используются праймеры, разработанные Ioos и Frey (см. таблицу) [9].

После амплификации проводят электрофорез продукта ПЦР и визуализацию результатов с помощью гель-документирующих систем. Данный метод позволяет работать не только с чистыми культурами, но и с мицелием, взятым с поверхности пораженного растения или плода, а также с ДНК гриба, выделенной непосредственно из поврежденной ткани плода [9].

Другим методом идентификации грибов рода *Monilinia* является мультиплексная ПЦР. В отличие от классической ПЦР, при мультиплексной ПЦР в одной и той же реакционной среде происходит процесс коампликации нескольких ДНК-матриц с участием нескольких пар праймеров. Это позволяет одновременно диагностировать несколько патогенов в одном эксперименте. Для видов *M. fruticola*, *M. laxa* и *M. fructigena* разработаны как классическая мультиплексная ПЦР, так и в реальном времени. Метод классической мультиплексной ПЦР Côté позволяет определить такие виды, как *M. laxa*, *M. fruticola*, *M. fructigena* и *M. polystroma*, не только из чистых культур, но и из гниющих плодов яблок, даже если образец содержит смешанную ДНК нескольких видов [3].

Метод мультиплексной ПЦР в реальном времени, предложенный Guinet (2016), позволяет определить *M. laxa*, *M. fruticola*, *M. fructigena* в смешанном образце. Разработаны специфичные праймеры и зонды на каждый из 3 видов. Мультиплексная ПЦР в реальном времени оказалась чувствительнее, чем классический вариант, предложенный Côté [7].

Наиболее распространенным методом идентификации *M. fruticola* является метод ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами

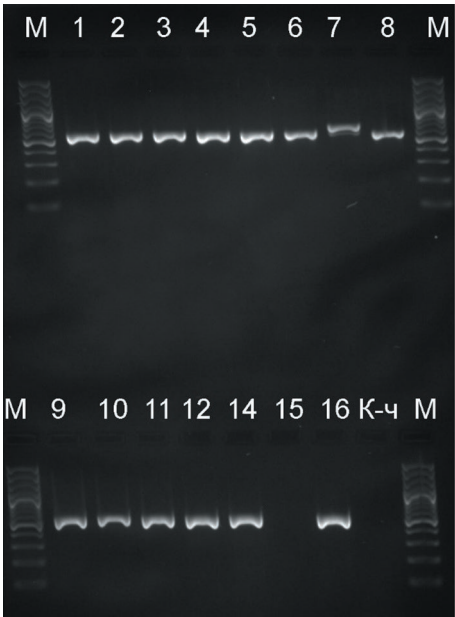


Рис. 3. Фотография агарозного геля после ПЦР с праймерами ITS5 и ITS4: 1–16 – образцы, К-ч – отрицательный контроль, М – маркер (фото Д.И. Шухина)

Fig. 3. Photo of agarose gel after PCR using ITS5 and ITS4 primers: 1–16 – samples, K-ч – negative control, M – marker (photo by D.I. Shukhin)

database. The accuracy of the technique is high enough, however it should be noted that the time of the study is long, because only pure fungal culture is suitable for it (minimum three days are required to grow the colony).

Conventional PCR with specific primers is based on the amplification of the ITS site specific for only one species. To identify *M. fruticola*, *M. laxa* and *M. fructigena* primers, developed by Ioos and Frey are used (see table) [9].

After amplification electrophoresis of PCR product and visualization of results by means of gel-documenting systems are carried out. This technique allows working not only with pure cultures, but also with mycelium taken from the surface of the affected plant or fruit, as well as with DNA of the fungus isolated directly from the damaged tissue of the fetus [9].

Another technique to identify fungi of the genus *Monilinia* is multiplex PCR. In contrast to conventional PCR, during multiplex PCR the same reaction medium is used to coamplify multiple DNA-matrix with several pairs of primers. This allows several pathogens to be simultaneously diagnosed in a single experiment. For *M. fruticola*, *M. laxa* and *M. fructigena*, both conventional multiplex PCR and qPCR have been developed. Conventional multiplex PCR by Côté allows identifying species such as *M. laxa*, *M. fruticola*, *M. fructigena* and *M. polystroma* not only from pure cultures but also from rotting apple fruits, even if the sample contains mixed DNA of several species [3].

Multiplex qPCR proposed by Guinet (2016) allows identifying *M. laxa*, *M. fruticola*, and *M. fructigena* in a mixed sample. Specific primers and probes for each of the 3 species have been developed. Multiplex qPCR

Таблица  
Праймеры для идентификации грибов рода *Monilinia* методом классической ПЦР [9]

Вид	Пара праймеров	Последовательность 5' → 3'
<i>M. fruticola</i>	ITS1Mfcl ITS4Mfcl	TATGCTCGCCAGAGGATAATT TGGGTTTTGGCAGAAGCACACT
<i>M. laxa</i>	ITS1Mlx ITS4Mlx	TATGCTCGCCAGAGAATAATC TGGGTTTTGGCAGAAGCACACC
<i>M. fructigena</i>	ITS1Mfgn ITS4Mfgn	CACGCTCGCCAGAGAATAACC GGTGTTTTGCCAGAAGCACACT

Mon139F (5'-CACCTTGTGTATYATTACTTTGTTGCTT-3') и Mon139R (5'-CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAA-3') и набором зондов P\_fc и P2-fgn/lx/ps, разработанными van Brouwershaven и др. [12]. Данный метод позволяет достоверно отличить *M. fruticola* от других видов рода *Monilinia*, в частности *M. fructigena*, *M. laxa* и *M. polystroma* [5, 12].

Для идентификации *M. fruticola* в ФГБУ «ВНИИКР» в настоящий момент используется набор реагентов «Фитоскрин Monilinia-PB» (ЗАО «Синтол», Москва), основанный на описанных выше праймерах и зондах. С набором поставляется положительный контроль, содержащий ДНК *M. fruticola*, а также контроль, содержащий ДНК *M. fructigena*, *M. laxa* и *M. polystroma*. При наличии в образце ДНК *M. fruticola* прибор детектирует рост флуоресценции по каналу FAM, при наличии в образце ДНК остальных 3 видов происходит рост флуоресценции по каналу ROX. Канал HEX является внутренним контролем реакции (рис. 4).

Несмотря на широкую распространенность метода ПЦР в реальном времени, в данный момент ведутся разработки по усовершенствованию методов идентификации *M. fruticola*.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ РОДА *MONILINIA* С ПОМОЩЬЮ MALDI-TOF MS

Перспективным методом идентификации вредных организмов является технология матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-ToF MS).

Данный метод применяется для идентификации бактерий, а также в медицинских исследованиях. В фитосанитарном исследовании данный метод еще не нашел широкого применения ввиду дорогостоящего оборудования, необходимости подготовки квалифицированного персонала. Суть метода заключается в ионизации биологических молекул (пептидов, белков, ДНК, олигонуклеотидов и др.) особой матрицей под воздействием лазера без их фрагментации и разрушения. Матрица – вещество, которое при воздействии лазерного импульса обеспечивает передачу энергии лазера молекулам исследуемого объекта, ионизируя их и переводя

was more sensitive than its conventional version proposed by Côté [7].

The most common identification technique of *M. fruticola* is qPCR with view-specific primers Mon139F (5'-CACCTTGTGTATYATTACTTTGTTGCTT-3') and Mon139R (5'-CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAA-3') and a kit of P\_fc and P2-fgn/lx/ps probes developed by van Brouwershaven et al. [12]. This technique allows to reliably distinguish *M. fruticola* from other

species of the genus *Monilinia*, in particular, *M. fructigena*, *M. laxa*, and *M. polystroma* [5, 12].

To identify *M. fruticola*, FGBU “VNIIKR” currently uses the Фитоскрин Monilinia-RV kit (ЗАО Syntol, Moscow) based on the primers and probes described above. The kit is supplied with positive control containing DNA of *M. fruticola* as well as control with DNA of *M. fructigena*, *M. laxa*, and *M. polystroma*. If the DNA of *M. fruticola* is present in the sample, the device detects the fluorescence growth through the FAM channel; if the DNA of the other 3 species is present in the sample, the fluorescence growth through the ROX channel occurs. The HEX channel is an internal reaction control (Fig. 4).

Despite the widespread use of qPCR, there are ongoing developments to improve *M. fruticola* identification techniques.

IDENTIFICATION OF FUNGI OF THE GENUS *MONILINIA* BY MALDI-TOF MS

A promising technique of pest identification is the technology of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-ToF MS. This technique is used for bacterial identification as well as in medical research. In phytosanitary research, this technique has not yet been widely used due to expensive equipment and the need to train qualified personnel. The essence of the technique is ionization of biological molecules (peptides, proteins, DNA, oligonucleotides, etc.) by a special matrix under laser exposure without their fragmentation and destruction. Matrix is a substance which under the influence of a laser pulse provides transfer of laser energy

Table  
Primers for identification of fungi of the genus *Monilinia* by conventional PCR [9]

Species	Primer pair	Sequence 5' → 3'
<i>M. fruticola</i>	ITS1Mfcl ITS4Mfcl	TATGCTCGCCAGAGGATAATT TGGGTTTTGGCAGAAGCACACT
<i>M. laxa</i>	ITS1Mlx ITS4Mlx	TATGCTCGCCAGAGAATAATC TGGGTTTTGGCAGAAGCACACC
<i>M. fructigena</i>	ITS1Mfgn ITS4Mfgn	CACGCTCGCCAGAGAATAACC GGTGTTTTGCCAGAAGCACACT

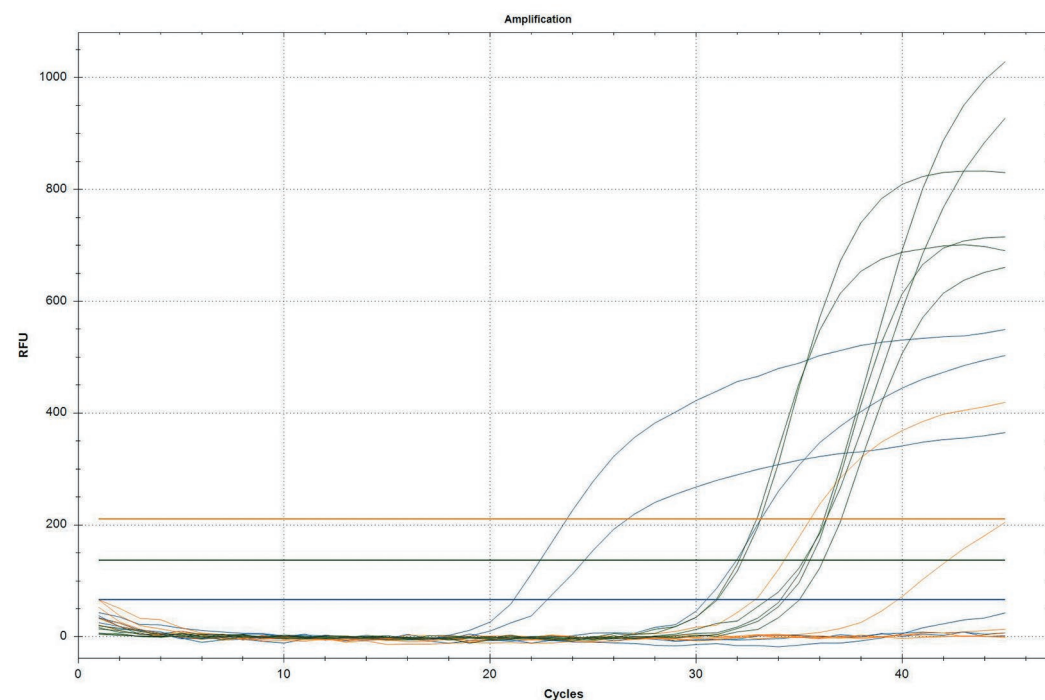


Рис. 4. Вид кривой амплификации при проведении ПЦР в реальном времени с набором «Фитоскрин Monilinia-PB». График голубого цвета – флуоресценция по каналу FAM, оранжевого – по каналу ROX, зеленого – по каналу HEX (фото Д.И. Шухина)

Fig. 4. Shapes of qPCR amplification curves with Fitoskrin Monilinia-PBkit. Diagram in blue – fluorescence growth through the FAM channel, orange – through the ROX channel, green – through the HEX channel (photo by D.I. Shukhin)

в газовую фазу. После десорбции молекулы образца ускоряются в электрическом поле и достигают детектора прибора. Скорость движения и время прохождения расстояния от точки ионизации до детектора обратно пропорциональны массе ионов. Зная длину пути перемещения иона от ионизатора до детектора, а также время этого перемещения, можно вычислить скорость движения иона и на основании ее значения рассчитать массу частиц, присутствующих в образце, а также генерировать спектр, характеризующий качественный состав исследуемого объекта. Данный состав отличается у организмов, что позволяет сравнить полученный результат с базой данных производителя оборудования [1].

Freimoser и др. удалось достоверно идентифицировать *M. fructicola* и *M. laxa* из образцов, полученных из чистых культур, а также из мицелия с поверхности инфицированных плодов. При этом различить виды *M. fructigena* и *M. polystroma* не удалось. При анализе прибор не выявил различий в их составе, поэтому они были сгруппированы в один кластер. Подобные результаты получены при анализе мицелия, отобранного с поверхности поврежденных плодов [4].

Согласно результатам эксперимента, данный метод позволяет достоверно отличить *M. fructicola* и *M. laxa* от других видов рода *Monilinia*, однако, как уже было отмечено, этот метод требует дорогостоящего оборудования, квалифицированного персонала, а также базы данных фитопатогенов, которые на настоящий момент отсутствуют.

#### ВЫЯВЛЕНИЕ ЛАТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ

Серьезной проблемой при выявлении грибов рода *Monilinia* является длительный период латентной инфекции, при котором отсутствуют видимые

to molecules of the object under study, ionizing and translating them into a gas phase. After desorption the sample molecules accelerate in an electric field and reach the detector of the device. The speed and time of travel from the ionization point to the detector are inversely proportional to the mass of the ions. Knowing the length of the path of movement of the ion from the ionizer to the detector, as well as the time of this movement, it is possible to calculate the speed of movement of the ion and based on its value to calculate the mass of particles present in the sample, as well as to generate a spectrum that characterizes the qualitative composition of the object under study. This composition differs in organisms, which allows comparing the obtained result with the database of the equipment manufacturer [1].

Freimoser et al. managed to reliably identify *M. fructicola* and *M. laxa* from samples obtained from pure cultures as well as from mycelium taken from the surface of infected fruits. However, he did not succeed in distinguishing between *M. fructigena* and *M. polystroma*. The analysis did not reveal any differences in their composition, so they were grouped into one cluster. Similar results were obtained in the analysis of mycelium taken from the surface of damaged fetuses [4].

According to the results of the experiment, this technique allows to reliably distinguish *M. fructicola* and *M. laxa* from other species of the genus *Monilinia*, but, as it has already been noted, it requires expensive equipment, qualified personnel, and databases of phytopathogens, which are currently absent.

симптомы поражения грибом как на плодах, так и на посадочном материале.

На сегодняшний день самым распространенным методом выявления латентной инфекции в плодах и цветках является Overnight freezing-incubation technique (ONFIT). Сутью этого метода является провокация гриба к прорастанию посредством воздействия низких температур [11].

Поверхность подозрительных плодов стерилизуют раствором хлора (32 мл 0,5%-го гипохлорита натрия, 32 мл 95%-го этанола и 0,01 мл Tween 20 в 2 л воды), затем промывают 3 раза стерильной водой и помещают на стерильные экраны в стерильные пластмассовые контейнеры со 150 мл дистиллированной воды на дне (или использовать увлажненную фильтровальную бумагу). Затем контейнеры помещают в морозильную камеру на  $-16^{\circ}\text{C}$  от 10 до 24 часов. После этого контейнеры помещают в термостат на  $23-25^{\circ}\text{C}$  на 5 суток. К этому времени инфекция проявляется в виде спородонхий на поверхности плодов [11].

Несмотря на достаточно высокую эффективность и простоту метода, анализ продукции на наличие латентной инфекции занимает от 7 до 9 дней. При появлении споронии нельзя однозначно сказать, какой из видов *Monilinia* вызвал гниль, поэтому необходим либо культуральный метод, либо молекулярная идентификация патогенов [5].

Существуют опыты по искусственному заражению плодов и цветков нектаринов *M. fructicola* и *M. laxa* и выделению ДНК возбудителя непосредственно из тканей растения, с последующей постановкой ПЦР в реальном времени [6].

Для заражения цветков и плодов использовали суспензию спор с концентрацией  $10^6$  конидий/мл для цветков и 105 конидий/мл для плодов. Затем образцы инкубировали 24 часа при  $25^{\circ}\text{C}$ . После этого поверхность образцов простерилизовали и поместили в холодильник на  $4^{\circ}\text{C}$  на 5 дней для установления латентной формы инфекции. Далее образцы заморозили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , лиофилизовали и гомогенизировали. Из полученных образцов выделили ДНК и провели ПЦР в реальном времени. В это же время был проведен опыт по искусственному заражению цветков и плодов нектаринов, при этом для выявления латентной инфекции использовался упомянутый выше метод ONFIT [6].

В результате опытов было показано, что метод ONFIT позволил выявить латентную инфекцию только в 67% образцов, тогда как ПЦР в реальном времени с высокой точностью позволила выявить латентную инфекцию в 100% образцов. При этом использование ПЦР в реальном времени позволило сократить время анализа с 7–9 дней до 24–48 часов [6].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Своевременная и точная идентификация грибов рода *Monilinia* – непростая задача, поскольку они обладают сходными растениями-хозяевами, симптомами поражения и культурально-морфологическими признаками. Для идентификации грибов рода *Monilinia* на данный момент разработано несколько методов, самым надежным и быстрым из которых является ПЦР в реальном времени. Также перспективным является метод MALDI-ToF MS, который,

#### LATENT INFECTION IDENTIFICATION

A serious problem in the detection of fungi of the genus *Monilinia* is a long period of latent infection, in which there are no visible symptoms of damage by fungus, both on the fruit and planting material.

To date, the most common technique to identify latent infection in fruits and flowers is Overnight freezing-incubation technique (ONFIT). This technique provokes the fungus to germinate by exposure to low temperatures [11].

The surface of suspicious fruits is sterilized with a chlorine solution (32 ml 0.525% sodium hypochlorite, 32 ml 95% ethanol and 0.01 ml Tween 20 in 2 liters of water), then washed 3 times with sterile water and placed on sterile screens in sterile plastic containers with 150 ml of distilled water at the bottom (or humidified filter paper is used). The containers are then placed in the freezer at  $-16^{\circ}\text{C}$  for 10 to 24 hours. After that containers are placed in a thermostat at  $23-25^{\circ}\text{C}$  for 5 days. By this time the infection appears in the form of sporodochia on the surface of fruit [11].

Despite rather high efficiency and simplicity of the method, analysis of products for latent infection takes from 7 to 9 days. When sporulation occurs, it is not possible to unambiguously state which of the *Monilinia* species caused the decay, so either a cultural or molecular identification technique of pathogens is necessary [5].

There are experiments on the artificial infection of nectarine fruits and flowers by *M. fructicola* and *M. laxa* and the extraction of the pathogen DNA directly from plant tissues, with subsequent qPCR [6].

A spore suspension with a concentration of  $10^6$  conidium/ml for flowers and 105 conidium/ml for fruits was used to infect flowers and fruits. The samples were then incubated for 24 hours at  $25^{\circ}\text{C}$ . Then the specimens were sterilized and placed in a refrigerator at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 days to establish the latent form of infection. The samples were then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , lyophilized and homogenized. DNA was isolated from the obtained samples and qPCR was performed. At the same time, an experiment was conducted in artificially infecting nectarine flowers and fruits, and the above-mentioned ONFIT technique was used to detect latent infection [6].

Experiments have shown that ONFIT only detected latent infection in 67% of samples, while qPCR with high accuracy detected latent infection in 100% of samples. qPCR reduced the analysis time from 7–9 days to 24–48 hours [6].

#### CONCLUSION

Timely and accurate identification of fungi of the genus *Monilinia* is not an easy task as they have similar host plants, symptoms of lesions and cultural and morphological characteristics. Several techniques have been developed so far to identify the fungi of the genus *Monilinia*, the most reliable and fastest of which is qPCR. MALDI-ToF MS is also promising, which, according to the literature, can distinguish *M. laxa* from *M. fructicola*, but not other species.

The problem of latent infection in fruits and planting material remains important. At present, new pathogen detection and identification techniques are being



согласно литературным данным, позволяет отличить *M. laxa* от *M. fructicola*, но не другие виды.

Важной остается проблема латентной инфекции в плодах и посадочном материале. В настоящий момент ведутся разработки новых методов выявления и идентификации патогенов, основанные на выделении ДНК гриба из растения-хозяина и последующей постановке ПЦР в реальном времени.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – № 2. – С. 3–8. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/maldi-tof-mass-spektrometricheskij-analiz-dlya-identifikatsii-vozbuditeley-chumy-holery-i-tulyaremii/viewer>.
- Дудченко И.П., Копина М.Б. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бурой монилиозной гнили *Monilinia fructicola* (Winter) Honey. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2017. – 52 с.
- Côté M.J., Tardif M.C., Meldrum A.J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR // Plant Disease. – 2004. – Vol. 88, No. 11. – P. 1219–1225.
- Freimoser F.M. et al. Direct identification of *Monilinia* brown rot fungi on infected fruits by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2016. – Vol. 3, No. 1. – P. 7.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Proficiency of real-time PCR detection of latent *Monilinia* spp. infection in nectarine flowers and fruit // Phytopathologia Mediterranea. – 2017a. – Vol. 56, No. 2. – P. 242–250.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Detection of latent *Monilinia* infections in nectarine flowers and fruit by qPCR // Plant Disease. – 2017b. – No. 101. – P. 1002–1008.
- Guinet C. et al. One-step detection of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* on *Prunus* and *Malus* by a Multiplex Real-Time PCR assay // Plant Disease. – 2016. – Vol. 100, No. 12. – P. 2465–2474.
- Hrustić J. et al. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species // Pesticidi i fitomedicina. – 2012. – Vol. 27, No. 4. – P. 283–297.
- Ioos R., Frey P. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR // European Journal of Plant Pathology. – 2000. – Vol. 106, No. 4. – P. 373–378.
- Lane C.R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters // EPPO Bulletin. – 2002. – Vol. 32, No. 3. – P. 489–493.
- Michailides T.J., Morgan D.P. et al. Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruit (abstr.) // Phytopathology. – 2000. – No. 90. – P. 48.
- Van Brouwershaven I.R. et al. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops // Plant Pathology. – 2010. – Vol. 59, No. 3. – P. 548–555.
- White T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – Vol. 18, No. 1. – P. 315–322.

developed based on the extraction of the fungal DNA from the host plant and subsequent qPCR.

REFERENCES

- Afanasev M.V., Mironova L.V., Balakhonov S.V. MALDI-ToF mass spectrometric analysis for identification of plague, cholera and tularaemia pathogens [MALDI-ToF mass-spektrometricheskij analiz dlya identifikatsii vozbuditelej chumy, holery i tulyaremii]. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 2: 3–8. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/maldi-tof-mass-spektrometricheskij-analiz-dlya-identifikatsii-vozbuditeley-chumy-holery-i-tulyaremii/viewer> (in Russian).
- Dudchenko I.P., Kopina M.B. Methodological recommendations for the detection and identification of brown *Monilinia fructicola* (Winter) Honey brown rot [Metodicheskie rekomendacii po vyavleniyu i identifikatsii vozbuditelya buroj monilioznoj gnili *Monilinia fructicola* (Winter) Honey]. М.: FGBU “VNIIKR”, 2017 (in Russian).
- Côté M.J., Tardif M.C., Meldrum A.J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*. 2004; 88 (11): 1219–1225.
- Freimoser F.M. et al. Direct identification of *Monilinia* brown rot fungi on infected fruits by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2016; 3 (1): 7.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Proficiency of real-time PCR detection of latent *Monilinia* spp. infection in nectarine flowers and fruit. *Phytopathologia Mediterranea*. 2017a; 56 (2): 242–250.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Detection of latent *Monilinia* infections in nectarine flowers and fruit by qPCR. *Plant Disease*. 2017b; 101: 1002–1008.
- Guinet C. et al. One-step detection of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* on *Prunus* and *Malus* by a Multiplex Real-Time PCR assay. *Plant Disease*. 2016; 100 (12): 2465–2474.
- Hrustić J. et al. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. *Pesticidi i fitomedicina*. 2012; 27 (4): 283–297.
- Ioos R., Frey P. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 2000; 106 (4): 373–378.
- Lane C.R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *EPPO Bulletin*. 2002; 32 (3): 489–493.
- Michailides T.J., Morgan D.P. et al. Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruit (abstr.). *Phytopathology*. 2000; 90: 48.
- Van Brouwershaven I.R. et al. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathology*. 2010; 59 (3): 548–555.
- White T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990; 18 (1): 315–322.

УДК 632.3

# Диагностика бегомовирусов методом ПЦР

Е.Н. ЛОЗОВАЯ, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР»,  
e-mail: [evgeniyaf@mail.ru](mailto:evgeniyaf@mail.ru)

Ю.Н. ПРИХОДЬКО, к. с.-х. н., ведущий научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»,  
e-mail: [prihodko\\_yuri59@mail.ru](mailto:prihodko_yuri59@mail.ru)

Т.С. ЖИВАЕВА, научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: [zhivaeva.vniikr@mail.ru](mailto:zhivaeva.vniikr@mail.ru)

Ю.А. ШНЕЙДЕР, к. б. н., и. о. заместителя директора ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: [yury.shneyder@mail.ru](mailto:yury.shneyder@mail.ru)

**Аннотация.** Род *Begomovirus* включает более 190 видов вирусов, являющихся вредоносными патогенами овощных и полевых культур. Широко распространенный в Европе бегомовирус желтой курчавости листьев томата (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) является карантинным объектом для Российской Федерации, ЕАЭС и ЕОКЗР. Идентификация бегомовирусов до видового уровня сопряжена с определенными трудностями, обусловленными высокой идентичностью их генома. В статье приводятся результаты испытания 19 пар универсальных и специфических праймеров для диагностики бегомовирусов: вируса желтой курчавости листьев томата TYLCV, вируса желтой курчавости листьев томата Сардиния (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV) и Нью-Дели вируса курчавости листьев томата (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) методами классической ПЦР и ПЦР в реальном времени.

**Ключевые слова.** Бегомовирусы, вирус желтой курчавости листьев томата (TYLCV), полимеразная цепная реакция, универсальные и специфические праймеры, специфичность, чувствительность, воспроизводимость.



од Begomovirus входит в семейство Geminiviridae. Геминивирусы – одно из немногих семейств вирусов растений, геном которых состоит из одной или двух молекул кольцевой одноцепочечной ДНК. Вирионы геминивирусов также имеют уникальную морфологию, так как состоят из двух неполных икосаэдров размером около 38 x 22 нм (рис. 1).

Род Begomovirus является самым крупным в семействе Geminiviridae и в настоящее время включает 388 видов, распространенных преимущественно в странах с тропическим и субтропическим климатом. Представители этого рода заражают

UDC 632.3

# Diagnosis of begomoviruses by PCR

E.N. LOZOVAIA, Researcher of the Postgraduate Study Department of FGBU “VNIIKR”,  
e-mail: [evgeniyaf@mail.ru](mailto:evgeniyaf@mail.ru)

Y.N. PRIKHODKO, PhD in Agriculture, Leading Researcher of the Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”, e-mail: [prihodko\\_yuri59@mail.ru](mailto:prihodko_yuri59@mail.ru)

T.S. ZHIVAEVA, Researcher of the Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”,  
e-mail: [zhivaeva.vniikr@mail.ru](mailto:zhivaeva.vniikr@mail.ru)

Y.A. SHNEYDER, PhD in Biology, Acting Deputy Director of FGBU “VNIIKR”,  
e-mail: [yury.shneyder@mail.ru](mailto:yury.shneyder@mail.ru)

**Abstract.** The genus *Begomovirus* includes more than 190 species of viruses, which are harmful pathogens of vegetable and field crops. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), which is widely spread in Europe, is a quarantine object for the Russian Federation, EAEU and EPPO. Identifying begomoviruses to the species level involves certain difficulties due to the high identity of their genome. The article presents the results of testing 19 pairs of universal and specific primers for the diagnosis of begomoviruses: tomato leaf curl virus (TYLCV), tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV), and tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) by conventional and real-time PCR methods.

**Keywords.** Begomoviruses, tomato leaf curl virus (TYLCV), polymerase chain reaction, universal and specific primers, specificity, sensitivity, reproducibility.

The genus Begomovirus is part of the Geminiviridae family. Geminiviruses are one of the few plant virus families whose genome consists of one or two molecules of a single-chain circular DNA. Virions of geminiviruses also have a unique morphology, as they consist of two incomplete icosahedrons about 38 x 22 nm (Fig. 1).

The genus *Begomovirus* is the largest in the Geminiviridae family and currently includes 388 species,