

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский университет дружбы народов имени  
Патриса Лумумбы»

*На правах рукописи*

**Башкирова Ида Геннадьевна**

**ИЗУЧЕНИЕ ФИТОПЛАЗМ ИЗ ГРУПП APPLE PROLIFERATION И  
STOLBUR С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Смирнова Ирина Павловна,  
доктор биологических наук

Москва – 2023

## Оглавление

Введение.....	4
Глава I. Обзор литературы по группам Apple proliferation и Stolbur.....	12
1.1. Современные виды классификации фитоплазм.....	12
1.1.1. Классификация по принципу филогенетического анализа.....	17
1.1.2. Классификация по принципу ПДРФ-анализа.....	20
1.2. Морфологические и биологические свойства фитоплазм, сферы их распространения.....	23
1.3. Существующие методы диагностики фитопатогенных микроорганизмов.....	32
1.3.1. Биологические методы идентификации.....	32
1.3.1.1. Растения-индикаторы.....	33
1.3.1.2. Микроскопические методы идентификации.....	34
1.3.1.3. Серологические методы идентификации.....	36
1.3.1.4. Молекулярно-генетические методы.....	37
Глава II. Материалы и методы.....	41
2.1. Материалы исследований.....	41
2.2. Сбор зараженного растительного материала.....	42
2.3. Молекулярно-генетические методы идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur.....	43
2.3.1. Подготовка проб к анализу и выделение ДНК.....	43
2.3.1.1. Методика Doyle & Doyle.....	45
2.3.1.2. Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb».....	46
2.3.1.3. Набор реагентов «СОРБ-ГМО-Б».....	48
2.3.1.4. Набор реагентов «ФитоСорб».....	49
2.3.1.5. Комплект реагентов «Проба-ГС».....	51
2.3.1.6. Комплект реагентов «Проба-НК».....	51
2.3.1.7. Набор «DNeasy Plant Mini Kit».....	52
2.3.2. Применение метода ПЦР для идентификации фитоплазм.....	54

2.3.2.1. Универсальная диагностика фитоплазм.....	57
2.3.2.2. Идентификация фитоплазм из группы Apple proliferation.....	59
2.3.2.3. Идентификация фитоплазмы из группы Stolbur.....	62
2.4. Биоинформатический анализ и статистическая обработка данных	63
Глава III. Результаты и их обсуждение.....	65
3.1. Распространение фитоплазм на территориях Российской Федерации и зарубежных стран.....	65
3.2. Сравнительное исследование экстракции ДНК фитоплазм различными методами.....	71
3.3. Оптимизация идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом полимеразной цепной реакции.....	82
3.3.1. Использование олигонуклеотидов для выявления фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом ПЦР-РВ.....	87
3.3.2. Использование праймеров для диагностики фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом вложенной ПЦР.....	94
3.4. Видовая идентификация фитоплазм из группы Apple proliferation....	98
3.5. Видовая идентификация фитоплазмы из группы Stolbur.....	110
3.6. Видовой анализ фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом секвенирования.....	112
Заключение.....	121
Выводы.....	127
Список сокращений.....	128
Библиографический список использованных источников.....	129
Приложения.....	148

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Фитоплазмы являются одними из наиболее опасных микроорганизмов для растений. В 2017 году отмечалось 50-летие со дня открытия фитоплазм и вироидов. Впервые фитоплазмы были описаны в 1967 году японскими учеными в ультратонких срезах флоэмы растений шелковицы (Doi et al., 1967; Гирсова и др., 2013). Первоначально данные организмы были названы как «микоплазмоподобные организмы» (МПО) (McCoy et al., 1989; Seemüller et al., 1998) из-за сходства с микоплазмами животных и восприимчивостью к антибиотикам тетрациклинам (Doi et al., 1967; Ishiie et al., 1967; МСФМ 27, 2018).

Фитоплазменная инфекция часто является фатальной для растений, приводящая к огромным потерям сельскохозяйственной продукции по всему миру и принимающая характер эпифитотий. Фитоплазмы являются причиной заболевания нескольких сотен видов растений, нарушают симбиотическое равновесие экосистем (McCoy et al., 1989; Lee et al., 2000).

Фитоплазмы являются большой монофелитической группой внутри класса Mollicutes. Другими представителями данного класса является род *Spiroplasma*, несколько видов из рода *Acholeplasma*, они близки к таким бактериям, как *Bacillus*, *Clostridium* и *Streptococcus* (Свиридова, Ванькова, 2012; Гирсова и др., 2013). На первых этапах исследования этих микроорганизмов было их визуальное наблюдение, затем изучение с использованием методов микроскопии при флуоресцентном окрашивании реагентом DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола). Однако наблюдать инфекцию удавалось не во всех частях растения.

Фитоплазмы невозможно идентифицировать с помощью традиционных культуральных приемов: нельзя выделить монокультуру, они труднодоступные. Данные микроорганизмы не культивируются на искусственных питательных средах (Namba, 2019).

Использование иммуноферментного анализа (ИФА, ELISE) позволило расширить возможности изучения этих микроорганизмов, однако, метод обладал низкой чувствительностью и не позволял идентифицировать до вида.

Современные молекулярно-генетические методы активно проникают в различные области наук, в частности, в микробиологию. Они расширяют и углубляют информацию о микроорганизмах. В 1990 году исследователи стали применять метод ПЦР в сочетании с методом ПДРФ-анализа для изучения фитоплазм. По чувствительности он превосходил ранее используемый метод ИФА в сотни раз (Матяшова, 2017). Последним этапом в изучении фитоплазм было использование метода секвенирования – метода расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК (Namba, 2019).

Молекулярно-генетические методы в изучении идентификации микроорганизмов, в частности, фитоплазм занимают приоритетное направление. На современном этапе изучения выявления, диагностики и идентификации фитоплазм была выбрана филогенетическая классификация этих микроорганизмов.

В основе филогенетической идентификации фитоплазм лежит определение нуклеотидной последовательности участков 16S-23S рРНК генов (Woese, 2000). Наличие этого фрагмента позволяет провести выявление и определение наличия фитоплазмы, с последующим секвенированием, позволяющим установить вид микроорганизма. Идентификация микроорганизмов является основополагающим звеном в научных исследованиях.

Быстрая, чувствительная, точная и ранняя идентификация этих микроорганизмов необходима для разработки средств борьбы с заболеваниями растений. Для применения определенных методов диагностики, необходимо понимание таксономического положения возбудителей болезней растительных культур.

Микроорганизмы из группы Apple proliferation (16SrX): *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, и из группы Stolbur (16SrXII) – *Candidatus Phytoplasma solani* являются одними из

наиболее опасных и экономически значимых патогенов для плодово-ягодных культур не только для Российской Федерации, но и для других стран (Picard et al., 2018; gd.eppo.int).

Распространение опасных фитопатогенных микроорганизмов чаще всего связано с импортом посадочного растительного материала. Существующие методические указания по выявлению и идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) и Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*), как и для других особо опасных микроорганизмов, требуют усовершенствования и оптимизации молекулярно-генетических методов исследований.

В связи с этим, необходимостью является определение зон распространения фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на территории Российской Федерации, совершенствование методов выявления и идентификации возбудителей фитоплазмозов. Перспективно в этом направлении является использование современных молекулярно-генетических методов.

**Степень разработанности темы.** Идентификация особо опасных фитоплазм продолжает оставаться актуальной проблемой не только для микробиологии, сельского хозяйства, но и для экологии. Изучение распространения фитоплазм, совершенствование методов их диагностики и идентификации являются актуальной задачей данного исследования.

**Цель работы:** изучение распространения, выявления и идентификации особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с помощью молекулярно-генетических методов диагностики.

**Задачи исследования:**

1) изучить распространение и методы выявления особо опасных видов фитоплазм групп Apple proliferation и Stolbur из некоторых регионов Российской Федерации и зарубежных стран;

2) провести сравнительный анализ методов выделения ДНК фитоплазм из растительного материала с помощью отечественных и зарубежных наборов реактивов;

3) выбрать и оптимизировать молекулярно-генетические методы диагностики и идентификации микроорганизмов из групп Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) и Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*);

4) изучить и апробировать отечественные тест-системы для проведения ПЦР в исследовании видовой идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur;

5) осуществить видовой анализ фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на основе изучения фрагмента 16S-23S гена методом секвенирования по Сэнгеру.

**Научная новизна.** Исследована степень распространения особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на территории Российской Федерации и некоторых зарубежных стран.

Впервые осуществлено сравнительное изучение и апробация методов выделения ДНК фитоплазм из растительного материала с использованием классической методики Doyle & Doyle (PM 7/62 (3), 2020), наборов реагентов отечественных компаний ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика», зарубежного набора компании Qiagen (США) для изучения микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur.

Впервые для выявления и идентификации изучаемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur подобраны оптимальные реакционные смеси отечественного производства для проведения ПЦР и определена оптимальная температура отжига у праймеров fU5/rU3 (Lorenz et al, 1995), для использования их при идентификации фитоплазм.

Для видовой идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur успешно апробированы тест-системы отечественного производства (ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика»).

Определена видовая идентификация, полученных в ходе исследований, нуклеотидных последовательностей на основе изучения участков 16S-23S рРНК гена. Получены оригинальные нуклеотидные последовательности фитоплазм

*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation, которые депонированы в Международную базу данных NCBI.

**Теоретическая и практическая значимость.** 1) Выбраны оптимальные методы экстракции ДНК фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur.

2) Определены оптимальные реакционные смеси для проведения метода ПЦР в исследовании видовой идентификации микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur.

3) Успешно апробированы отечественные тест-системы для видовой идентификации фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri* (группа Apple proliferation), *Candidatus Phytoplasma solani* (группа Stolbur).

4) Полученные нуклеотидные последовательности микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation депонированы в Международную базу данных NCBI (ID MG748693, MG748692, MG748694), на основе изучения 16S-23S рРНК гена. Результаты зарегистрированы также в Европейском нуклеотидном архиве ENA и в Японском банке ДНК данных DNA Data Bank для дальнейшего использования исследователями для разработки методов видовой идентификации и других практических целей.

5) Разработаны методические указания «Диагностика ряда карантинных фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов с использованием диагностических наборов производства ООО «АгроДиагностика» (Приходько Ю.Н., Бондаренко Г.Н., Башкирова И.Г. и др. Москва, 2020, 34 с.).

6) Разработаны методические рекомендации по выявлению и идентификации фитоплазмы Европейской желтухи плодов косточковых *Candidatus Phytoplasma prunorum* SEEMÜLLER & SCHNEIDER (Инв. № 75-2020 МР ВНИИКР; Рег. № НИОКТР АААА-А20-120072060002-6) (Бондаренко Г.Н., Башкирова И.Г. ВНИИКР, Москва, 2020, 56 с.).

7) Подготовлены два обучающих видеоролика на фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma rugii* в рамках видеопроекта «Видеопедия. Карантинные объекты Российской Федерации» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) и ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») для электронного учебного пособия в системе образования РФ.

**Методология и методы исследований.** В исследованиях использовали современные молекулярно-генетические методы, стандартные методики, научно-исследовательскую литературу и современные методы биоинформатического анализа. Подробное описание методов представлено в главе «Материалы и методы».

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1) Проведено исследование по распространению и выявлению фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на образцах отечественного и импортного растительного материала, полученного из некоторых регионов Российской Федерации, а также некоторых регионов зарубежных стран.

2) Впервые изучены в сравнении и апробированы методы экстракции ДНК фитоплазм из растительного материала с использованием классической методики Doyle & Doyle, наборов реагентов отечественных (ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика») и зарубежных (Qiagen, США) компаний.

3) Впервые для выявления и идентификации изучаемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur подобраны оптимальные условия проведения ПЦР с использованием отечественных реактивов, установлена температура отжига для универсальных праймеров.

4) Изучены и успешно апробированы тест-системы для быстрой и точной видовой идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur отечественных компаний ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика».

5) Получены оригинальные нуклеотидные последовательности и осуществлена их видовая идентификация, на основе изучения участков 16S-23S

pРНК гена. Нуклеотидные последовательности микроорганизмов из группы Apple proliferation депонированы в Международную базу данных NCBI.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на 1-ом Международном конгрессе по молекулярным методам защиты растений «Молекулярные подходы к лучшей защите растений» (1st International Molecular Plant Protection Congress «Molecular Approaches for Better Plant Protection») (Адана, Турция, 2019); заседании 4-й Международной рабочей группы фитоплазмологов (4th International Phytoplasmatologist Working Group) (Валенсия, Испания, 2019); Всероссийском съезде по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России» (ВИЗР 90 лет) (Санкт-Петербург, 2019); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2020); 10-й международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов» (Краснодар, 2021); Международной научной конференции «Агробиотехнология-2021» (Москва, 2021); на 16-ом Конгрессе Средиземноморского фитопатологического союза (16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union) (Лимассол, Кипр, 2022). Материалы диссертационного исследования были доложены и представлены к апробации на совместном заседании кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т. и кафедры микробиологии МИ РУДН. Работа рекомендована к защите (Протокол № 1-4-22 от 08 апреля 2022 г.).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертационное исследование соответствует пунктам паспорта научной специальности 1.5.11. Микробиология: 2. Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; 3. Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 работ. Из них 3 – статьи в изданиях, включенных в международные базы данных (Scopus), 2 – статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень

ВАК РФ/РУДН. Разработаны методические указания и методические рекомендации.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, библиографического списка и приложения. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц, 39 рисунков, 5 приложений. Библиографический список используемой литературы включает 171 источник, из которых 128 зарубежных.

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа представляет собой законченный, самостоятельно выполненный труд автора. Все представленные в диссертации результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. Автором проанализированы отечественные и зарубежные литературные источники по теме диссертации, получены и обобщены результаты исследования. В работах, выполняемых в соавторстве, использованы результаты исследований с долей личного участия автора 80-95%.

**Место выполнения экспериментальной работы.** Исследования проводили на кафедре биохимии имени академика Березова Т.Т. ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», в ООО «Синтол» Центр коллективного пользования ВНИИСБ «Биотехнология».

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н. И.П. Смирновой за всестороннюю помощь и внимание при выполнении диссертации; благодарность А.А. Шварцеву, к.б.н. Ю.А. Шнейдеру, к.б.н. Е.В. Каримовой, к.б.н. Г.Н. Бондаренко за идеи, консультации при проведении экспериментов и за помощь в овладении современными молекулярно-генетическими методами; д.б.н., член-кор., проф. М.С. Гинсу, д.м.н., проф. В.С. Покровскому, к.м.н., доц. И.В. Подопригора за советы и помощь; коллективу ФГБУ «ВНИИКР» за предоставление приборов и материалов для исследования; родным и друзьям за помощь и поддержку.

## Глава I. Обзор литературы по группам *Apple proliferation* и *Stolbur*

### 1.1. Современные виды классификации фитоплазм

Классификация микроорганизмов традиционно основывалась на морфологических признаках, что иногда также отражает их эволюционную историю (филогению). Внедрение молекулярно-генетических методов привело к революции в области таксономии микроорганизмов (Лысак, 2007; Баранов, 2014; Леванова, Захарова, 2017). Геном прокариот представлен нуклеоидом (аналог хромосомы) и плазмидами. В состав хромосомы входят: структурные гены, которые кодируют белки, спейсеры (межгенные участки) и регуляторные области, контролирующие экспрессию генов (Слизень, Титов, 2007; Равин, Шестаков, 2013).

Фитоплазмы являются большой группой внутри класса *Mollicutes* и являются облигатными прокариотами (МСФМ 27, 2018). Со времени первоначального предложения *Mollicutes* как класса (Freundt, Edward, 1967) прошло более 50-ти лет. Представители класса *Mollicutes* были обнаружены во многих местах.

Тривиальное название «микоплазма» охватывает все виды, входящие в класс *Mollicutes*, то есть род *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma*, *Ureaplasma* и др. (Rottem, Barile, 1993). Они близки к таким бактериям, как *Bacillus*, *Clostridium* и *Streptococcus* (Свиридова, 2012; Гирсова и др., 2013). Для различия микроорганизмов из класса *Mollicutes*, чаще всего, используют тривиальные термины, соответствующие названию рода (рис. 1). Например, представители рода *Mycoplasma* называются микоплазмами; представители рода *Ureaplasma* называются уреаплазмами, представители рода *Spiroplasma* называются спироплазмами и так далее (plantpathology.ba.ars.usda.gov).

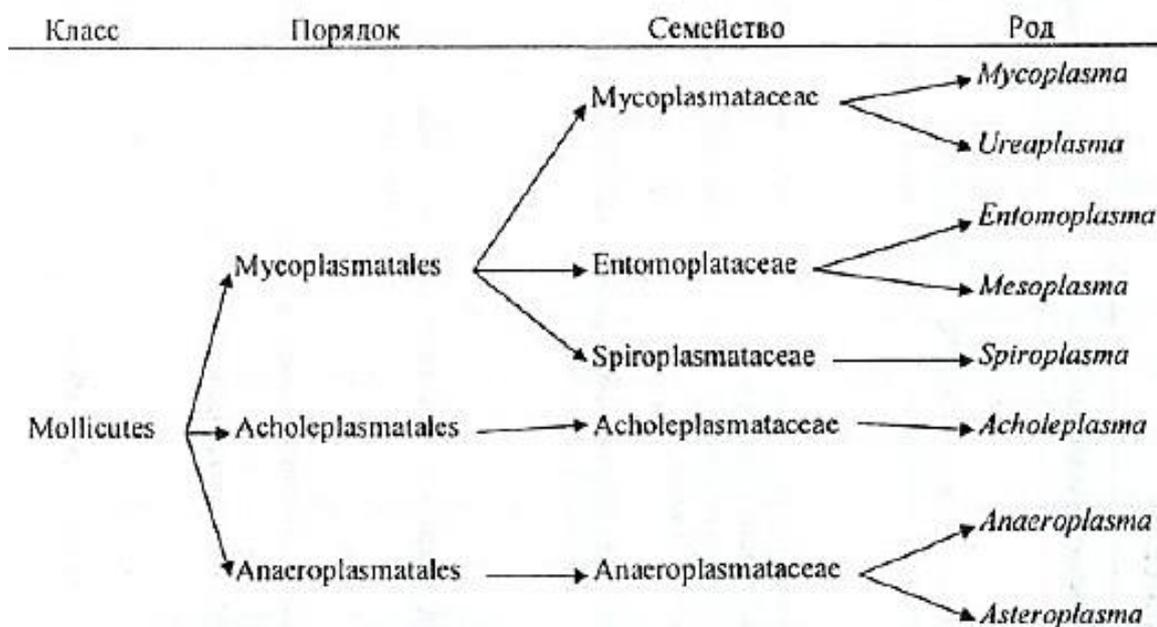


Рисунок 1 – Таксономия микоплазм по Razin&Herrmann, 2002 (Чернова и др., 2008)

Принятая систематика микоплазм была несовершенна, поэтому многолетние исследования позволили перегруппировать существующие таксоны. Высокий темп реорганизации генома является источником таксономических трудностей (Чернова и др., 2008).

Анализ на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), разработанный в конце 1980-х и начале 1990-х годов способствовал более чувствительному обнаружению и классификации микоплазм растений (Lee et al., 2000).

В 1992 году, на 9-м конгрессе международной организации микоплазмологов было принято тривиальное название «фитоплазма» (phytoplasma) для определения прокариот, принадлежащих к этой группе (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1993; IRPCM, 2004).

В 2004 году, на основе соглашения международного комитета систематической бактериологии по таксономии фитоплазм была определена таксономическая группа «*Candidatus Phytoplasma (Ca. P.)*» для объединения растительных патогенов, не спиралевидных микоплазм. Новые описанные виды фитоплазм должны иметь уникальную последовательность гена 16S рРНК,

состоящую более чем из 1200 пар нуклеотидов (п.н.) и иметь сходство последовательностей не более чем 97,5% (IRPCM, 2004).

Был введен термин «*Candidatus*» для описания прокариотических таксонов, для которых имеются молекулярные данные, но для которых отсутствуют характеристики бактериологического кода. Представители класса Mollicutes, которые не культивируются, относятся к «*Candidatus*» (Whitcomb, 1988; Johansson, Pettersson, 2002). Определение таксономического статуса фитоплазм традиционными методами, применяемыми к прокариотам, было затруднено из-за их неспособности к росту в условиях *in vitro* (Doi et al., 1967; Гирсова и др., 2013).

Все известные виды *Candidatus* Phytoplasma являются растительными фитопатогенами. Известны три вида из рода *Spiroplasma* патогенных для растений. Остальные виды из рода *Spiroplasma* являются паразитами членистоногих, включая насекомых, креветок и крабов ([plantpathology.ba.ars.usda.gov](http://plantpathology.ba.ars.usda.gov)).

Учитывая, что один и тот же фитоплазменный штамм может вызывать различные симптомы у разных растений-хозяев, а разные штаммы фитоплазм могут иметь общие векторы распространения насекомыми, этот подход не может обеспечить достоверную классификацию фитопатогенов.

Современная систематика фитоплазм приняла многофазную систему таксономии, основанную на фенотипических, генотипических и филогенетических критериях классификации членов класса Mollicutes (Vandamme et al., 1996; Razin et al., 1998, [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Комплексные филогенетические исследования, основанные на изучении гена 16S рРНК, легко размещали фитоплазмы в классе Mollicutes (рис. 2), т.е. бактерии, лишенные клеточной стенки (Seemüller et al., 1998; Martini et al., 2007; Гирсова и др., 2013).

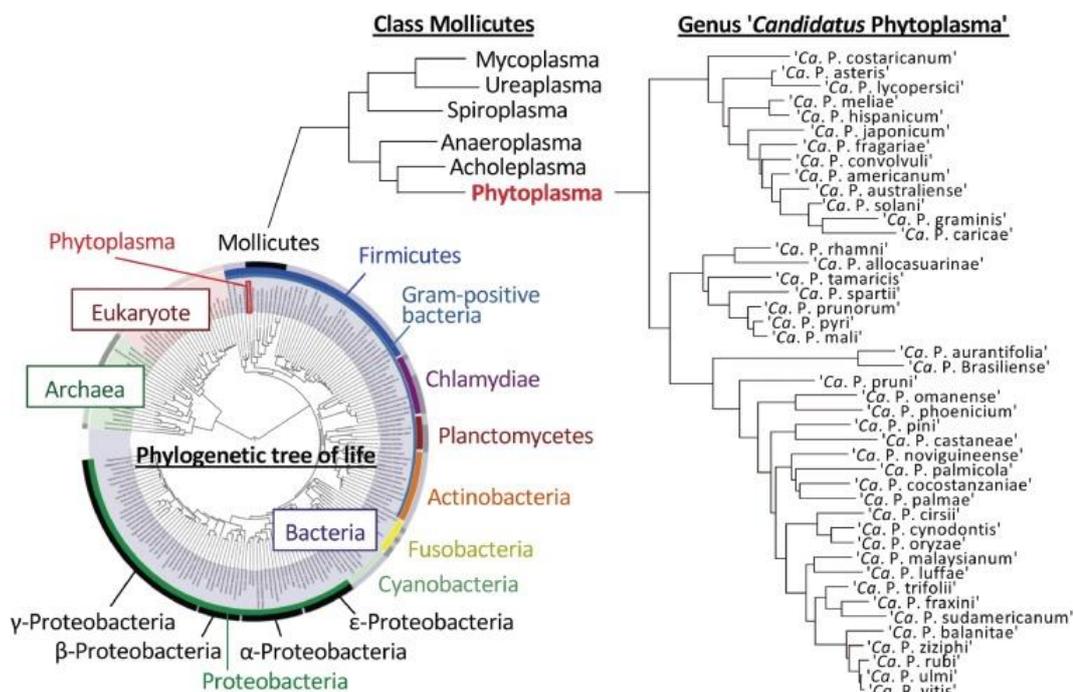


Рисунок 2 – Фитоплазмы включены в класс Mollicutes, но они образуют отдельную группу, обозначенную как новый род *Candidatus Phytoplasma* (Namba, 2019)

**Таксономическое положение:** царство Bacteria, тип Tenericutes (ранее был тип Firmicutes), класс Mollicutes, отдел Acholeplasmatales, семейство Acholeplasmataceae, род *Candidatus Phytoplasma* (ncbi.nlm.nih.gov; eppo.int).

В работе проводили исследование четырех видов из рода *Candidatus Phytoplasma*. Представители из группы **Apple proliferation** (AP, 16SrX):

1) *Candidatus Phytoplasma mali* (Seemüller, Schneider, 2004), эквивалент: *Phytoplasma mali*. Синонимы: Apple proliferation phytoplasma, Apple witches' broom phytoplasma.

Общепринятые названия заболевания: возбудитель пролиферации яблони (рус.), Apple proliferation (AP), Witches' broom of apple, Proliferation of apple (англ.), Proliferaciones del manzano (исп.), Maladie du prolifération du pommers (франц.), Scorazzi del melo (итал.), Triebsucht des Apfels (нем.) и др.

Количество штаммов (согласно Taxonomy Browser NCBI на декабрь 2021г.): 98.

Код ЕОКЗР: PHYRMA (cabi.org; eppo.int; Bertaccini et al., 2014; ncbi.nlm.nih.gov; PM 1/2 (28), 2019).

**2) *Candidatus Phytoplasma pyri*** (Seemüller, Schneider, 2004), эквивалент: *Phytoplasma pyri*. Синонимы: Pear decline phytoplasma.

Общепринятые названия заболевания: возбудитель истощения груши (рус.), Pear decline (PD), Leaf curl of pear, Decline of pear (англ.), Decaimento del peral (исп.), Deperissement du Poirier (франц.), Birnenverfal (нем.), Moria del pero (итал.) и др.

Количество штаммов (согласно Taxonomy Browser NCBI на декабрь 2021г.): 20.

Код ЕОКЗР: PHYPY (cabi.org; eppo.int; Bertaccini et al., 2014; ncbi.nlm.nih.gov; PM 1/2 (28), 2019).

Фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* включены в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕАЭС), как ограниченно распространенные на территории ЕАЭС карантинные вредные организмы (Башкирова и др., 2018; vniikr.ru).

**3) *Candidatus Phytoplasma prunorum*** (Seemüller, Schneider, 2004), эквивалент: *Phytoplasma prunorum*. Синонимы: European stone fruit yellows phytoplasma, Apricot chlorotic leafroll phytoplasma

Общепринятые названия заболевания: возбудитель Европейской желтухи косточковых (рус.), European stone fruit yellows (ESFY), Chlorotic leafroll of apricot, Nectarine chlorotic leaf roll, Leptonecrosis of Japanese plum, Decline of Japanese plum, Peach rosette (англ.), dépérissement de Molières, enrroulement chlorotique de l'abricotier (франц.), chlorotisches Blattrollen: Steinobst (нем.), accartocciamento clorotico dell'albicocco (итал.), enrollamiento clorótico (исп.) и др.

Количество штаммов (согласно Taxonomy Browser NCBI на декабрь 2021г.): 36.

Код ЕОКЗР: PHYPPR (cabi.org; eppo.int; Bertaccini et al., 2014; ncbi.nlm.nih.gov; PM 1/2 (28), 2019).

Представители из группы **Stolbur** (16SrXII):

4) *Candidatus Phytoplasma solani* (Quaglino et al. 2013), эквивалент: *Phytoplasma solani*. Синонимы: Stolbur phytoplasma, Grapevine bois noir phytoplasma, Potato stolbur phytoplasma.

Общепринятые названия заболевания: возбудитель почернения коры винограда, Столбур картофеля (рус.), Bois Noir (BN), Black wood of grapevine, STOL, Stolbur of potato (англ.), Bois noir de la vigne, Dépérissement de la lavande (франц.), Legno nero (итал.), Vergilbungskrankheit der Rebe (нем.) и др.

Количество штаммов (согласно Taxonomy Browser NCBI на декабрь 2021г.): 238.

Код ЕОКЗР: PHYPSO (cabi.org; eppo.int; Bertaccini et al., 2014; ncbi.nlm.nih.gov; PM 1/2 (28), 2019).

Развитие молекулярных методов позволило провести исследование генома этой группы организмов, определить консервативные гены и разработать классификацию, основанную на генетических критериях. В литературе представлены и широко используются на практике две основные схемы классификации групп фитоплазм. Обе схемы основаны на генетической информации, кодируемой участками гена 16S рРНК.

Первая схема классификации основана на филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей. Другая, более удобная, схема классификации основана на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) участков 16S гена (Namba et al., 1993; Schneider et al., 1995; Seemüller et al., 1998; Firrao et al., 2005; Гирсова и др., 2013; Приходько, Матяшова, 2015).

### 1.1.1. Классификация по принципу филогенетического анализа

Филогения (филогенетическая таксономия) – концепция исторического развития мира и эволюционных модификаций (Леванова, Захарова 2017).

Диагностика фитоплазм и их филогенетический анализ основаны на исследовании 16S гена и спейсерной области 16S-23S генов рРНК, для которых разработан комплекс праймеров (Woese, 2000). Ген 16S рРНК является наиболее широко используемым маркером для предварительной классификации

фитоплазм, а взаимоотношения организмов представляют графически в виде филогенетических деревьев (Lee et al., 1993, 2000; Wei et al., 2007). При этом конечная генотипическая характеристика фитоплазм основана на полной последовательности генома (Coenye et al., 2005).

В этой системе нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК разных фитоплазм проанализированы с помощью компьютерной программы выравнивания последовательностей, и рассчитан процент (%) идентичностей среди последовательностей. Текущая классификация видов рода «*Candidatus Phytoplasma*» основана на последовательности гена 16S рРНК, и пороговое значение сходства на 97,5% или менее с любым ранее описанным видом используется для предложения любых новых видов. К примеру, при межвидовом сравнении фитоплазм из группы Apple proliferation (16SrX): *Ca. P. mali* / *Ca. P. pyri*; *Ca. P. mali* / *Ca. P. prunorum* и *Ca. P. pyri* / *Ca. P. prunorum*, различия в последовательностях одного участка гена составляли 1,0-1,1%; 1,3-1,5% и 1,2-1,3%, соответственно (Seemüller et al., 1994; [plantpathology.ba.ars.usda.gov](http://plantpathology.ba.ars.usda.gov)). Представители из группы Stolbur (16SrXII) *Ca. P. solani* имеет сходство 97,6% с последовательностью 16S рДНК *Ca. P. australiense* ([cabi.org](http://cabi.org)).

Разделение фитоплазм основывалось на изучении нуклеотидной последовательности консервативного участка гена, а после и на других участках гена. Благодаря этому изучению удалось проводить исследования на определение видовой принадлежности фитоплазм. С помощью этой системы классификация микроорганизмов, инфицирующих растения, была в значительной степени расширена и обновлена, и было получено более 30 групп и 140 подгрупп из рода *Candidatus Phytoplasma* (Кастальева и др., 2018).

На основе последовательностей генов 16S фитоплазмы делятся на три различных кластера, внутри которого они сгруппированы по высокой схожести последовательности гена и с более высоким сходством друг с другом. На рисунке 3 показана дендрограмма гена 16S РНК, которое было получено благодаря методу максимального правдоподобия (способ построения оценки неизвестного

параметра путем максимизации функции правдоподобия) с помощью модели Тамуры-Нея, с общим количеством 1618 позиций, включенных в набор данных.

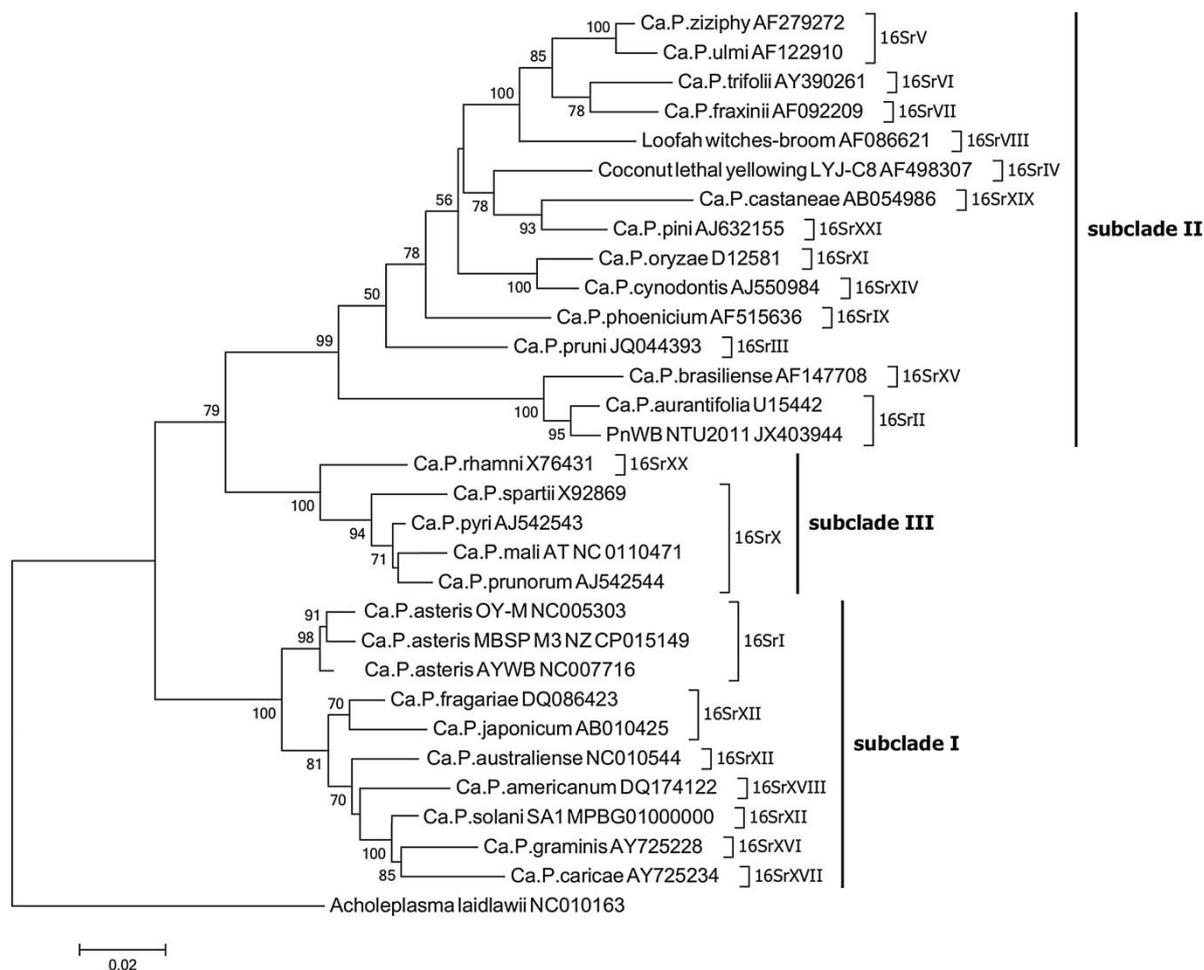


Рисунок 3 – Дендрограмма гена 16S РНК, полученная методом максимального правдоподобия (модель Тамуры-Нея) (Music et al., 2019)

Данную модель используют для оценки эволюционного расстояния, когда нуклеотидные частоты ( $g_A$ ,  $g_T$ ,  $g_C$ ,  $g_G$ ) различаются и есть выраженные нуклеотидные замены в последовательностях из двух сравниваемых форм (Носко, 2005; Смирязев, Панкина, 2013). Номера доступа в GenBank NCBI ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)) указаны рядом с названием каждого вида или штамма. Последовательность вида *Acholeplasma laylawii* была использована в качестве внешней группы для корня дерева. Соответствующие группы 16Sr на основе ПДРФ-анализе указаны в скобках (Music et al., 2019).

Согласно Национальному центру биотехнологической информации (NCBI) завершено секвенирование 38 полных геномов из рода *Candidatus Phytoplasma*: 16SrII (Peanut witches'-broom group) – 4; 16SrIII (X-disease group) – 5; 16SrIV

(Coconut lethal yellows group) – 1; 16SrV (Elm yellows group) – 1; 16SrIX (Pigeon pea witches'-broom group) – 2; 16SrX (Apple proliferation group) – 1; 16SrXI (Rice yellow dwarf group) – 1; 16SrXII (Stolbur group) – 3; 16SrXXI (Pine shoot proliferation group) – 1; *Candidatus* *Phytoplasma asteris* – 14 и 6 геномов еще не классифицированных видов ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Их сравнение позволило получить полезные сведения о разнообразии фитоплазм на молекулярном уровне (Bai et al., 2006; Tran-Nguyen et al., 2008).

### 1.1.2. Классификация по принципу ПДРФ-анализа

Разделение фитоплазм с использованием полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ / RFLP-анализ, Restriction Fragment Length Polymorphism) была предложена в начале 1990-х годов (Lee et al., 1993). Исследование генома происходит путем разрезания ДНК рестриктазами. Полученные участки 16S-23S гена видов фитоплазм сравниваются между собой.

Для классификации фитопатогенов на группы и подгруппы, методом ПДРФ-анализа, использовали сегмент гена 16S рНК. В предложенной системе каждая группа фитоплазм обозначается римской цифрой, а каждая подгруппа – заглавной буквой: например, 16SrX-B – вид *Candidatus* *Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation (16SrX). Точная классификация необходима для правильного разграничения и изучения видов и штаммов фитопатогенных организмов (Lee et al., 2010).

В течение последнего десятилетия число штаммов фитоплазмы, о которых сообщалось во всем мире, увеличилось в геометрической прогрессии. Чтобы быстрее классифицировать фитоплазмы, был разработан альтернативный подход с разработкой онлайн-инструмента (*iPhyClassifier*).

*iPhyClassifier* – это интерактивный онлайн-инструмент для быстрой идентификации и классификации разнообразных микроорганизмов растений ([plantpathology.ba.ars.usda.gov](http://plantpathology.ba.ars.usda.gov)). Сравнивая профили ПДРФ-анализа и последовательности генов 16S рНК, архивированные в базе данных ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov); [ebi.ac.uk](http://ebi.ac.uk); [ddbj.nig.ac.jp](http://ddbj.nig.ac.jp)) известных штаммов фитоплазмы,

*iPhyClassifier* может определить классификационный статус группы/подгруппы 16Sr запрашиваемого штамма и назначить вид рода *Candidatus Phytoplasma* (Wei et al., 2007, Zhao et al., 2009). Несколько новых групп 16Sr и десятки новых подгрупп были определены с помощью *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009, 2014; Fernández et al., 2015).

С помощью этой компьютеризированной системы, которая имитирует анализ ПДРФ, повысился процент точности фитоплазм на основе последовательностей генов 16S рНК (Zhao et al., 2010; Fránová et al., 2014).

На основе ПДРФ-анализа с помощью 17 рестрикционных ферментов (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*) исследователи построили комплексную классификационную схему фитоплазм (рис. 4). Классификация на основе ПДРФ-анализа близка к филогенетическому дереву, построенному при анализе последовательностей гена 16S рНК (Lee et al., 1993, 1998, 2000).

Было предложено, чтобы каждая группа представляла собой минимум один вид фитоплазмы (Lee et al., 1998, 2000, 2004a, 2004b; Al-Saady et al., 2008). В качестве ориентира для выбора нового вида был применен произвольный порог 2,5% несходства (IRPCM, 2004).

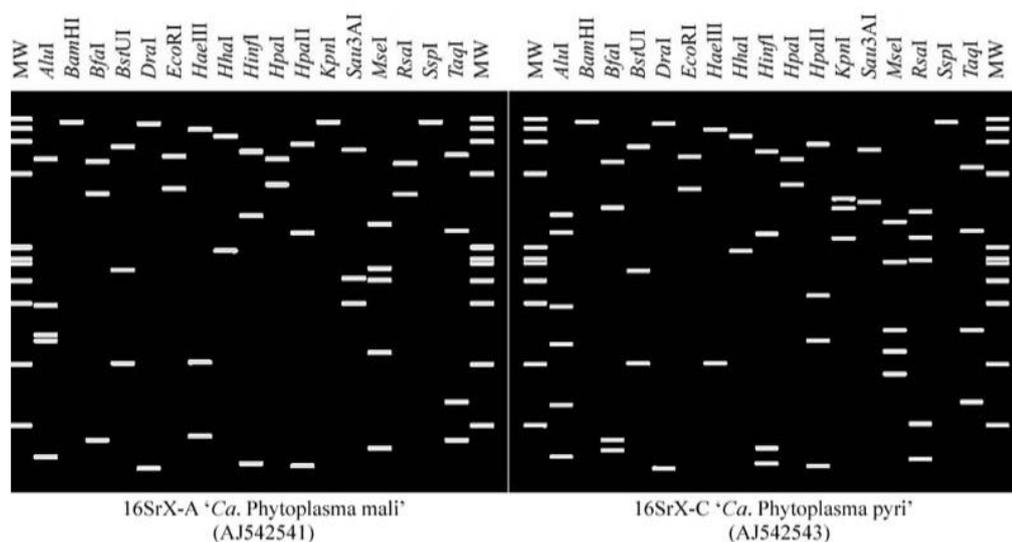


Рисунок 4 – Пример виртуальной модели ПДРФ-анализа расщепления фрагментов гена 16S рНК двух видов фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* с помощью 17 рестрикционных ферментов, где MW – маркер молекулярного веса (Wei et al., 2007; [plantpathology.ba.ars.usda.gov](http://plantpathology.ba.ars.usda.gov))

Использование других генов для идентификации фитоплазм необходимо для того, чтобы отделить близкородственные штаммы. Для идентификации и характеристики фитоплазм использовали межгенный спейсер 16S-23S рРНК, область 23S рРНК и потенциальные маркеры – гены: *Tuf*, кодирующий фактор элонгации; *rplV* (*rpl22*) и *rpsC* (*rps3*) рибосомальных белков; *SecY*, *SecA*, кодирующие субъединицы транслоказ белков; *map*, кодирующий белок метионин аминопептидазу; *uvrB–degV*, кодирующий субъединицу В экзонуклеазы и белок семейства DegV; *nusA*, кодирующий фактор элонгации, и *rpoB* – ген рибосомального белка (Зинченко и др., 2008; Lee et al., 2010).

В общей сложности было идентифицировано 36 различных групп (16Sr-группы), основанных на фактическом ПДРФ-анализе: 16SrI (Aster yellows group); 16SrII (Peanut witches'-broom group); 16SrIII (X-disease group); 16SrIV (Coconut lethal yellows group); 16SrV (Elm yellows group); 16SrVI (Clover proliferation group); 16SrVII (Ash yellows group); 16SrVIII (Loofah witches'-broom group); 16SrIX (Pigeon pea witches'-broom group); 16SrX (Apple proliferation group); 16SrXI (Rice yellow dwarf group); 16SrXII (Stolbur group); 16SrXIII (Mexican periwinkle virescence group); 16SrXIV (Bermudagrass white leaf group); 16SrXV (Hibiscus witches'-broom group); 16SrXVI (Sugarcane yellow leaf syndrome group); 16SrXVII (Papaya bunchy top group); 16SrXVIII (American potato purple top wilt group); 16SrXIX (Japanese chestnut witches'-broom group); 16SrXX (Buckthorn witches'-broom group); 16SrXXI (Pine shoot proliferation group); 16SrXXII (Nigerian coconut lethal decline (LDN) group); 16SrXXIII (Buckland Valley grapevine yellows group); 16SrXXIV (Sorghum bunchy shoot group); 16SrXXV (Weeping tea tree witches'-broom group); 16SrXXVI (Mauritius sugarcane yellows D3T1 group); 16SrXXVII (Mauritius sugarcane yellows D3T2 group); 16SrXXVIII (Havana derbid phytoplasma group); 16SrXXIX (Cassia witches'-broom group); 16SrXXX (Salt cedar witches'-broom group); 16SrXXXI (Soybean stunt phytoplasma group); 16SrXXXII (Malaysian periwinkle virescence group); 16SrXXXIII (Allocasuarina phytoplasma group); 16SrXXXIV (Pepper witches'-broom phytoplasma group); 16SrXXXV (New group

Bermuda Grass White Leaf); 16SrXXXVI (Foxtail palm yellow decline group) (Zhao et al., 2010; Yadav, Thesis, 2013; Zhao, Davis, 2016; ncbi.nlm.nih.gov).

## **1.2. Морфологические и биологические свойства фитоплазм, сферы их распространения**

Фитоплазмы являются внутриклеточными / мембранными паразитами, которые снижают иммунитет растения за короткий промежуток времени (Ванькова и др., 2007). Патогены растений являются облигатными фитопатогенными прокариотами (МСФМ 27, 2018), сходными с грамположительными бактериями рода *Firmicutes* (Шкаликов и др., 2010), но клетки фитоплазм, в отличие от бактерий, не имеют жестких клеточных стенок, а окружены трехслойной цитоплазматической мембраной (Doi et al., 1967; Гирсова и др., 2013).

Представители класса Mollicutes характеризуются своим небольшим размером генома (0,58=2,2 миллиона нуклеотидов, Mbp). Все фитоплазмы имеют более насыщенные А+Т-связями геномы, где содержание G+C-связей составляет в пределах 23-40% от всего генома (Whitcomb, 1988; Kollar et al., 1989; Johansson, Pettersson, 2002).

Геном фитоплазм размером 680-1600 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). Это самый маленький из известных геномов самореплицирующихся организмов (Christensen et al., 2005; Bertaccini, Duduk, 2009). Как и вирусы, фитоплазмы имеют малый размер – средний диаметр 200-800 нанометров (нм) (рис. 5) (Kirkpatrick, 1992; Lee et al., 2000). Размеры и организация известных геномов фитоплазмы заметно различаются. Они содержат различные комбинации круговых или линейных хромосом, различное количество внехромосомных плазмидоподобных элементов и используют триплетный код UGA в качестве стоп-кодона (Nejat, Vadamalai, 2013).

При использовании электронной микроскопии, во флоэме инфицированных растений наблюдают плеоморфные (меняющие форму или размер от условий окружающей среды), округлые, нитевидные или продолговатой формы тела

(Duduk, Bertaccini, 2011; Dickinson et al., 2013). В геноме отсутствует ряд генов, отвечающих за биосинтез (Bai et al., 2006; Oshima et al., 2013).

Фитоплазмы имеют два оперона рРНК (Schneider, Seemüller, 1994), в то время как большинство других микоплазм имеют только один (Gasparich et al., 2004; Гирсова и др., 2013). Оперон рРНК состоит из гена 16S рРНК, за которым следует внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) с содержанием в себе одной тРНК и ген 23S рРНК.

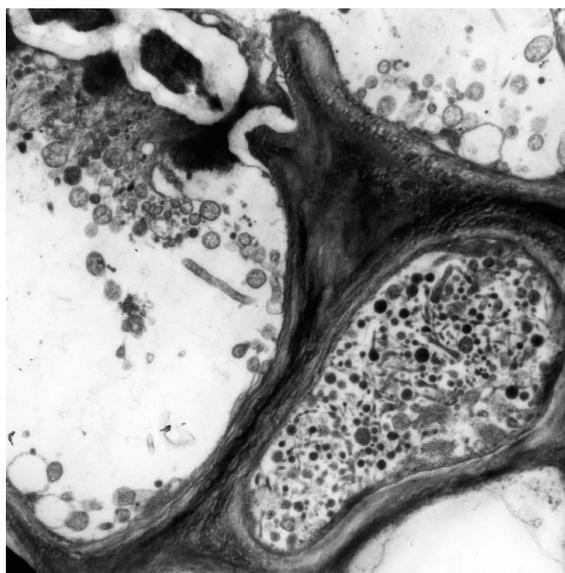


Рисунок 5 – Поперечное сечение ситовидных трубок растения с фитоплазмами под электронным микроскопом ( $\times 6000$ ) (Bertaccini et al., 2014)

У всех видов фитоплазм гены рибосомального белка (*rp*) являются частью одного большого оперона, оперона *rp*, который содержит не менее 21 гена: *rpsJ* (кодирующий рибосомальный белок S10), *rplC* (L3), *rplD* (L4), *rplW* (L23), *rplB* (L2), *rpsS* (S19), *rplV* (L22), *rpsC* (S3), *rplP* (L16), *rpmC* (L29), *rpsQ* (S17), *rplN* (L14), *rplX* (L24), *rplE* (L5), *rpsN* (S14), *rpsH* (S8), *rplF* (L6), *rplR* (L18), *rpsE* (S5), *rpmD* (L30) и *rplO* (L15) (Hodgetts, Dickinson, 2010).

Размер хромосом фитоплазм составляет от 530 т.п.н. до 1350 т.п.н. (IRPCM, 2004). У фитоплазм из группы Apple proliferation размер колеблется в пределах 640-680 т.п.н. у *Ca. P. mali*, около 660 т.п.н. – *Ca. P. rugi* и 630 т.п.н. – *Ca. P. prunorum*. У фитоплазмы *Ca. P. solani* (группа Stolbur) 821 т.п.н. (Seemüller, Schneider, 2007).

В геномах значительно сокращается количество генов, кодирующих основные метаболические пути. Фитоплазмы лишены генов для пентозофосфатного цикла, орнитинового цикла, биосинтеза нуклеотидов и синтеза фенилаланина (Tran-Nguyen et al., 2008; Nejat, Vadamalai, 2013). Потеря многих важных метаболических путей демонстрирует, что фитоплазмы сильно зависят от хозяина и живут в богатой питательными веществами среде (МСФМ 27, 2018; Nejat, Vadamalai, 2013).

Фосфатидилхолин является важной составной частью клеточных мембран. Можно предположить, что фитоплазмы могут образовывать, по крайней мере, часть своих собственных мембран. Это согласуется с тем, что фитоплазмы являются филогенетически близкими к роду *Acholeplasma* (Lee et al., 2000), которые также могут синтезировать фосфолипиды (Razin et al., 1998).

У фитоплазм отсутствует фермент для превращения лактата в пируват. Они используют малат (Bai et al., 2006), которая может служить единственным источником энергии для данных микроорганизмов (Hogenhout, Musić, 2010). Было выдвинуто предположение, что некоторые фитоплазмы секретируют различные эффекторные (вирулентные) белки, которые влияют на внутриклеточные процессы растений, что приводит к изменениям их в развитии (Hogenhout, Musić, 2010; Bai et al., 2009).

Фитоплазмы содержат системы для секреции различных белков. Система секреции типа *Sec* способствует взаимодействию белков мембраны фитоплазм с клетками растения-хозяина. Белки *SecY*, *SecE*, *SecG* и *SecA* составляют транслоказный комплекс, который действует как механизм экспорта на цитоплазматическую мембрану.

Фитоплазмы зависят от *SecA*-зависимой системы секреции белков. Последнее было основано на обнаружении, что геном фитоплазм содержит полный набор генов, необходимых для *SecA*-зависимой системы секреции белков (Hogenhout, Musić, 2010). Белки, секретируемые с помощью *SecA*-зависимой системы секреции белков у прокариот и эукариот, обычно имеют N-концевой сигнальный пептид (SP), длина которого может составлять от 20 до 50

аминокислот, и состоит из последовательного участка положительных, гидрофобных и полярных аминокислот (Schneider, Fechner, 2004). Система *Sec* также отвечает за секрецию белков в цитоплазму клетки, которые связаны с факторами патогенности, объясняют биологический цикл фитоплазмы и их способность к адаптации в двух разнообразных средах – флоэму растений и пищеварительный тракт различных насекомых (Oshima et al., 2013).

Компьютерное программное обеспечение, такое как SignalP (Menne et al., 2000; Bendtsen et al., 2004; cbs.dtu.dk), было разработано для распознавания сигнальных пептидов (SP) и сайтов расщепления SPs в белках. Это программное обеспечение было успешно использовано для идентификации потенциальных эффекторных белков в геномах фитоплазм. Программное обеспечение SignalP привело к обнаружению 20 секретиромых белков, которые остаются прикрепленными к клеточной мембране после секреции, и 56 белков, которые, по-видимому, высвобождаются во внеклеточную среду после секреции (Bai et al., 2009). 20 белков были охарактеризованы на основании наличия дополнительных трансмембранных (TM) областей в дополнение к SP. Этот список содержит антигенный мембранный белок (AMP), который, как показано, участвует в прикреплении фитоплазм к микрофиламентам в кишечнике насекомых. Это взаимодействие коррелирует со специфичностью вектора насекомого для передачи фитоплазмы (Suzuki et al., 2006). AMP принимает участие во взаимодействиях фитоплазма – растение-хозяин (Kakizawa et al., 2006).

Такие белки, как адгезины, протеазы и гидролитические ферменты, могут транспортироваться из цитоплазмы фитоплазмы на поверхность клетки или в цитоплазму растения-хозяина через путь *Sec*, и эти транспортируемые белки могут влиять на патогенность микроорганизма (Kakizawa et al., 2004). Ген *secY* кодирует белок, участвующий в механизме секреции белка из бактерий (в сочетании с *SecA* и другими продуктами гена). Ген *tuf*, кодирующий фактор элонгации Tu (EF-Tu), выполняет центральную роль в трансляции (Schneider et al., 1997), и существует единственная копия этого гена в геноме фитоплазмы (Hodgetts, Dickinson, 2010).

В результате анализа фрагмента нерибосомальной ДНК, состоящего из трех предполагаемых открытых рамок считывания (ORF) (в частности, ORF 2, кодирующей белок, наиболее гомологичный бактериальной нитроредуктазе), было доказано существование, по меньшей мере, трех разных подтипов фитоплазмы *Ca. P. mali* под названием AT-1, AT-2 и AP-15. Вирулентные и авирулентные изоляты *Ca. P. mali* существенно различаются по последовательности нуклеотидов на участке генов *hflB* и *imp*, а также на участке гена AP460 ATPase. Концентрация фитоплазмы в проводящих тканях может достигать до  $6,0 \times 10^9$  клеток / 1 г растительных тканей в зависимости от вирулентности изолятов патогена (Матяшова, 2017; Каримова и др., 2018).

С конца девятнадцатого века исследователи-микробиологи опирались на способность выращивать чистые культуры микроорганизмов на искусственных средах. Такая культура обеспечивает выделение, поддержание, размножение интересующих микроорганизмов и играет центральную роль во многих исследованиях микробной таксономии (Namba, 2019). Попытки культивировать фитоплазмы не увенчались успехом, в то время, как представители рода *Spiroplasma* (признанные ученым R. Davis) были культивированы (Maramorosch, 2011; Гирсова и др., 2013). Возможность выращивания фитоплазм в сложных средах исключалась более 40 лет из-за несоответствия первых испытаний изоляции, то есть невозможности культивирования фитопатогенных микроорганизмов (Doi et al., 1967; Гирсова и др., 2013; Contaldo, Bertaccini, 2019). В последнее время данным исследованием занимаются многие ученые. Следует отметить, что зарубежными учеными N. Contaldo и A. Bertaccini были представлены некоторые результаты по культивированию фитоплазм из сильно зараженных тканей виноградной лозы, маниоки и кокосовой пальмы, а в некоторых случаях из бессимптомных тканей деревьев или растений, произрастающих в сильно зараженных районах с использованием коммерческих сред (Contaldo et al., 2012; Богоутдинов и др., 2019; Contaldo, Bertaccini, 2019). Однако, культивировать фитоплазму сложно, и для поддержания требуется периодическая передача или трансплантация насекомого-вектора (Namba, 2019),

поэтому продолжается поиск питательных сред для культивирования данных микроорганизмов.

Размножаются фитоплазмы почкованием или бинарным делением клетки (Шкаликов и др., 2010). Выживают и развиваются микроскопические организмы в изотонических средах, обеспечиваемых растительной флоэмой и гемолимфой насекомых.

Некоторые симптомы заболеваний растений могут быть вызваны и воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды (недостаток элементов питания, влияние температуры и др.). Экологическая обстановка также влияет на распространение микроорганизмов. Температура окружающей среды влияет на заражение растений, на развитие и размножение фитопатогенов. Это особенно касается микроорганизмов, передающихся насекомыми. Оптимальной температурой для проявления симптомов и заражения фитоплазмами является температура в пределах 21-25°C, при которой наблюдается интенсивное проявление симптомов и возбудителя можно обнаружить в тканях всего растения. При более высокой температуре в пределах 29-32°C симптомы могут исчезать, фитопатоген при этом часто можно выявить лишь в корневой системе (Приходько, Матяшова, 2015; Матяшова, Морозова, 2016; Каримова и др., 2018).

Выделяют три известных механизма передачи фитоплазм: 1) с помощью насекомых; 2) при вегетативном размножении или прививанием зараженного растительного материала; 3) паразитическими растениями и неинфицированными растениями-хозяевами (Weintraub, Beanland, 2006; Ахатов и др., 2006; Бондаренко, Башкирова, 2018; Башкирова и др., 2018). Предполагается также, что распространение фитоплазм происходит и с помощью семян, но пока нет научных доказательств для поддержки этой идеи (Nipah et al., 2007).

От растения к растению фитоплазмы переносятся с помощью насекомых из отряда Homoptera (Равнокрылые (хоботные)). Чаще всего это насекомые из подотрядов Psyllinea (Листоблошки) и Cicadinea, или Auchenorrhyncha (Цикадовые). Фитоплазма сохраняется в организме переносчиков в течение всей их жизни (Tedeschi, Alma, 2006). Микроорганизм попадает внутрь насекомого при

питании на зараженном растении (через слюнные железы), где размножается в кишечном тракте. При перелете инфицированного насекомого происходит инфицирование нового растения через слюнные железы (Матяшова, 2017) (рис. 6).

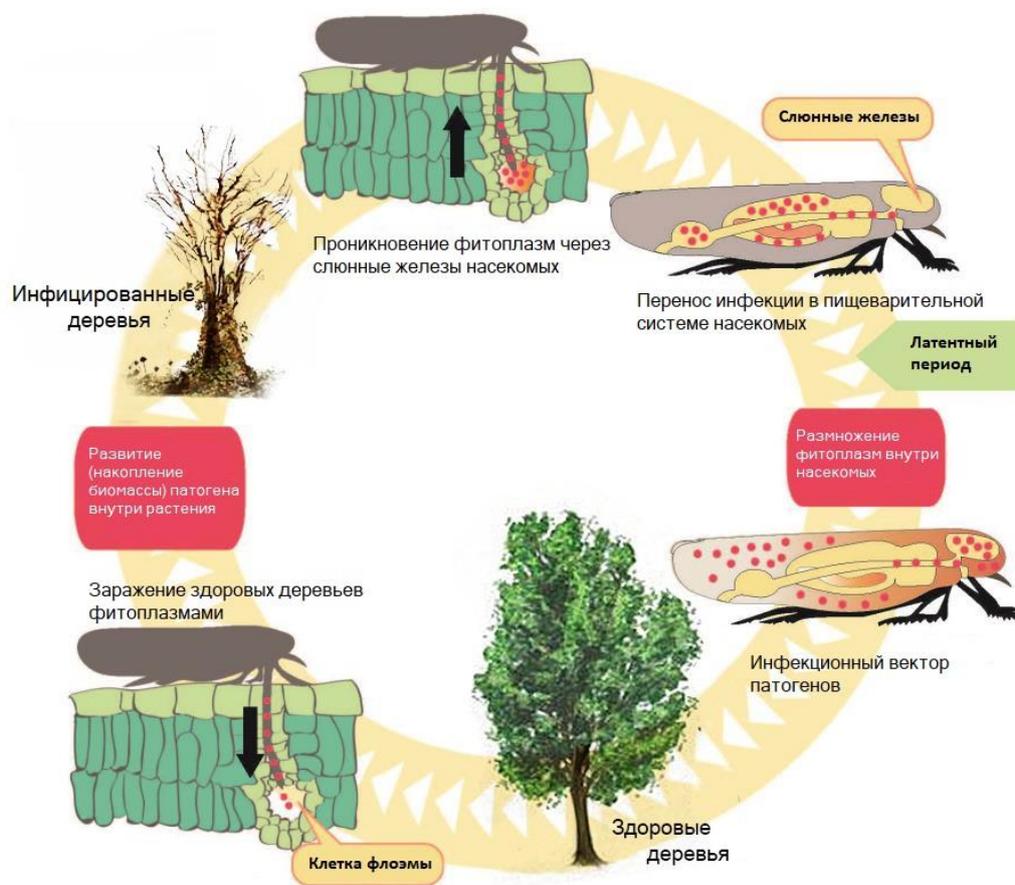


Рисунок 6 – Схема переноса фитоплазм от деревьев к насекомым и наоборот (фото Жоао Вила, 2016 с дополнениями автора)

Резерваторами фитоплазменной инфекции могут служить сорные растения (*Convolvulus* spp., *Urtica* spp., *Artemisia* spp. и др.) и некоторые древесно-кустарниковые растения (*Syringa* spp., *Ulmus* spp., *Ficus carica* L. и др. (Алейникова, Бондаренко, 2019).

Для фитоплазм группы Apple proliferation известен феномен «выздоровления», который заключается в исчезновении симптомов на деревьях, ранее имеющих явные признаки болезни. Установлено, что при этом растения остаются зараженными и сохраняют высокую концентрацию фитоплазмы в своих корнях (Carraro et al., 2004).

Растения, инфицированные фитоплазмами, проявляют различные симптомы: задержка роста, пожелтение или покраснение листьев, «ведьмины метлы» (пролиферация побегов), увядание, филлодии, виресценция, некроз флоэмы, уменьшение размера плода и их деформация, столбур и др. (Garnier et al., 2001; Гирсова и др., 2013; Богоутдинов и др., 2019).

Микроорганизм *Candidatus Phytoplasma mali* является возбудителем болезни пролиферация яблони (Apple proliferation, AP) (приложение А), которая впервые была отмечена в 1950 г. в районе Венето, Италия (Rui et al., 1950). В настоящее время фитопlasма *Candidatus Phytoplasma mali* выявлена в большинстве стран Европы (приложение Б), а также в Канаде, Сирийской Арабской Республике, Тунисе (gd.eppo.int; cabi.org).

Фитопатоген *Candidatus Phytoplasma pyri* вызывает болезнь истощение груши (Pear decline, PD), которая впервые описана в Британской Колумбии в 1948 г. (McLarty, 1948), а в 1957 г. найдена в Вашингтоне (Woodbridge et al., 1957; Nichols et al., 1960). Микроорганизм *Candidatus Phytoplasma pyri* обнаружен во многих странах Европы (приложение Б), а также в Аргентине, Иране, Канаде, Ливане, Ливии, США, Тунисе, Чили (gd.eppo.int; cabi.org).

Согласно Национальному докладу о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2020 году, два вида фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* были впервые обнаружены на территории РФ (Национальный доклад, 2021).

Фитопlasма *Candidatus Phytoplasma prunorum* вызывает болезнь Европейская желтуха косточковых (European stone fruit yellows, ESFY), фитопатоген широко распространен во многих странах Европы (приложение Б) (Шнейдер и др., 2017; gd.eppo.int; cabi.org).

Микроорганизм *Candidatus Phytoplasma solani* ассоциирован с заболеванием столбура (STOL), почернение коры винограда (Bois noir, BN) и поражает более 100 видов растений (Credi et al., 2006). Фитопlasма отмечена (приложение Б) в большинстве стран Европы, а также в Израиле, Индии, Иордании, Иране, Китае,

Ливане, Нигерии, Республике Киргизия, Республике Таджикистан, Республике Узбекистан, Чили, Японии (gd.eppo.int; cabi.org).

Фитоплазмы из групп *Apple proliferation* и *Stolbur* имеют разные естественные диапазоны растений-хозяев, различные векторы распространения насекомыми, а также различный набор характерных симптомов у инфицированных растений. Фитопатогенные организмы отличаются по серологическим свойствам, а также по нескольким ключевым молекулярным маркерам, включая спейсерную область 16S-23S рРНК (Seemüller, Schneider, 2004).

Растения-хозяева для микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (группа *Apple proliferation*), *Candidatus Phytoplasma solani* (группа *Stolbur*) широко распространены на территории Российской Федерации и возделываются как на государственных предприятиях агропромышленного комплекса, так и личных подсобных хозяйствах, кроме того дикорастущие виды встречаются в лесах, заповедниках и др. Культивирование в России многих сортов плодово-ягодных культур, которые инфицируются фитоплазмами из групп *Apple proliferation* и *Stolbur*, отсутствие мер борьбы с микроорганизмами, а также благоприятные погодные условия увеличивают риск возникновения экономического и экологического воздействия. Экономическое воздействие возбудителей на культуры на территории нашей страны выражается в снижении урожайности культур, росте и развитии растений. Происходит общее ослабление растений, вследствие чего они становятся восприимчивым к возбудителям грибных и вирусных заболеваний, и являются постоянными источниками инфекции (Каримова и др., 2018; Богоутдинов и др., 2018).

В настоящее время отсутствуют эффективные препараты для ликвидации фитоплазм, что также благоприятно для акклиматизации вредного организма (Smirnova et al., 2017; Каримова и др., 2018). Использование антибиотиков тетрациклинового класса подавляет распространение фитоплазмы в зараженных растениях, культивируемых *in vitro*. Антибиотики ингибируют синтез белка путем

связывания с рибосомными субъединицами 30S многих прокариот. Но высокие концентрации антибиотиков (> 100 частей на миллион, ppm) повреждают ткани растений (Aldaghi et al., 2008; Namba, 2019).

Использование здорового растительного материала, контроль за насекомыми-переносчиками являются одними из основных способов профилактики, защиты и борьбы с фитоплазмами.

### **1.3. Существующие методы диагностики фитопатогенных микроорганизмов**

Быстрая, чувствительная, точная и ранняя диагностика заболеваний фитоплазмой необходима для снижения их экономического воздействия. Было разработано несколько методов для точного и чувствительного обнаружения фитоплазм как в растениях-хозяевах, так и в переносчиках насекомых (Nejat, Vadamalai, 2013; Каримова и др., 2018).

Традиционная диагностика фитоплазм основывалась на исследовании биологических свойств и микроскопических методах микроорганизмов. Специфичное и чувствительное обнаружение фитопатогенных микроорганизмов основывалось на обнаружении гена 16S рРНК, в основном с использованием молекулярно-генетических анализов (ПЦР) (Firrao et al. 2005; Nejat, Vadamalai, 2013).

#### **1.3.1. Биологические методы идентификации**

В то время как определение фенотипических и генотипических признаков обеспечивало основу для дифференциации, идентификации и классификации культивируемых представителей из класса Mollicutes, первые попытки дифференцировать и классифицировать фитоплазмы основывались на знании определенных биологических свойств, таких как симптоматика, диапазон растений-хозяев и передача с помощью насекомых. Симптоматика была одним из основных критериев предварительной диагностики предполагаемых заболеваний фитоплазмой (Lee, Davis 1992; Nejat, Vadamalai, 2013).

### 1.3.1.1. Растения-индикаторы

Тесты на наличие микроорганизмов на древесных растениях-индикаторах в течение длительного времени оставались единственным методом выявления фитоплазм на плодовых и ягодных культурах. Растения-индикаторы связаны с некоторыми экологическими условиями. По их присутствию узнают о содержании определенных микроэлементов и веществ. Внешний вид и химический состав растений-индикаторов изменяется от влияния условий окружающей среды (Меженский, 2004). В качестве растения-индикатора используют мадагаскарский барвинок (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), который очень восприимчив к заражению фитоплазмой (рис. 7). Зарубежными учеными представлены результаты о том, что после заражения фитоплазмой в барвинке происходит выработка фиторегуляторов, полиамины, такие как путресцин, спермин и спермидин, фенолы, а также вторичные метаболиты (Favali et al., 2004). Ввиду высокой трудоемкости, тест на *C. roseus* не нашел практического применения в диагностической практике. Однако *C. roseus* оказался идеальным растением для длительного содержания коллекций фитоплазм.



Рисунок 7 – Здоровое (слева) и инфицированное *Candidatus Phytoplasma mali* (справа) растения *Catharanthus roseus* (фото Osler/DBADP, University of Udine, Italy) (cabi.org)

### 1.3.2. Микроскопические методы идентификации

Прямое обнаружение фитоплазм затруднено, потому что они не видны через обычный световой микроскоп. Поэтому используют электронный микроскоп (ЭМ), для этого растительный материал величиной 1 мм<sup>2</sup>, предварительно замачивают в течение 6-24 часов в 4-6% растворе глютаральдегида в буфере какодилатом натрия (рН 7,5). С помощью этилового спирта и ацетона удаляют воду из тканей, после помещают в специальные смолы для микроскопирования. Готовят срезы тканей флоэмы, окрашивают их уранил ацетатом и цитратом свинца и просматривают под микроскопом (Матяшова, Морозова, 2016).

Метод флуоресцентной микроскопии заключается в том, что при наблюдении препарата используют молекулы, обладающие флуоресцентными свойствами (Балалаева и др., 2012). При флуоресцентном окрашивании органов растений (черешки и центральные жилки листьев, верхушки молодых побегов) чаще всего используют реагент DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола). В ситовидных трубках проводящих тканей, при окрашивании, наблюдается скопление клеток фитоплазм (при длине волны 460 нм). Ученые А. К. Das и D. K. Mitra (Das, Mitra, 2004) визуализировали фитоплазму в виде ярких пятен с помощью флуоресцентной микроскопии во флоэме баклажана, с симптомами мелколистности, путем окрашивания DAPI. Метод обладает низкой чувствительностью и не является видоспецифичным. Преимуществом микроскопии является низкая стоимость анализа и быстрота проведения анализа (Girsova et al., 2010; Приходько. Матяшова, 2015; Каримова и др., 2018).

С помощью сканирующей электронной микроскопии, СЭМ (SEM, scanning electron microscopy) изображения получаются с высоким разрешением для выявления морфологии поверхности образца. Методы СЭМ были описаны для наблюдений фитоплазматических клеток во флоэме пораженных растений (Lebsky et al., 2011). Фитоплазмы описываются СЭМ как короткие разветвленные

нитевидные формы в ситовых элементах инфицированных растений (Nejat, Vadamalai, 2013).

Просвечивающая электронная микроскопия, ПЭМ (ТЕМ, transmission electron microscopy). Клетки фитоплазмы малы и плеоморфны, поэтому для их непосредственного наблюдения и изучения морфологических и структурных характеристик внутри ситовых трубок больного растения-хозяина требуется увеличение и разрешение электронного микроскопа. В течение более 30 лет ПЭМ оставался одним из самых надежных и эффективных методов обнаружения фитоплазм (Poghosyan et al., 2004). Этот метод позволил не только поставить диагноз, но и изучить взаимодействие растений с фитоплазмой (Chapman et al. 2001).

Однако методы электронной микроскопии (ЭМ) занимают много времени, требуют квалифицированного персонала и все еще дороги (Nejat, Vadamalai, 2013).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, КЛСМ (CLSM, confocal laser scanning microscopy) позволяет получить послойное изображение препарата в ходе сформированного светящегося пятна на заданной глубине. КЛСМ может использовать несколько флуоресцентных меток для выявления локализации определенных белковых молекул образца при применении (Лежнев и др., 2001). Химические интеркалирующие красители DiOC<sub>7</sub> (3) (красные кристаллы) и SYTO 13 (зеленая флуоресценция) являются специфическими жизненно важными красителями для мембранного потенциала клетки и ДНК, соответственно (Nejat, Vadamalai, 2013). ДНК-специфический краситель DAPI был заменен жизненно важным красителем SYTO 13 (Christensen et al., 2004).

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) позволяет определить место связывания ДНК-зонда, меченных флуорохромами, и комплементарным ему участком ядерной ДНК цитогенетического аппарата в геноме микроорганизма (Башкатов и др., 2008). Нерadioактивные олигонуклеотидные зонды позволяют обнаруживать фитоплазмы *in situ* как в тканях растений-хозяев, так и в переносчиках насекомых.

FISH можно применять для идентификации таксономических групп, подгрупп и/или штаммов фитоплазм, изучения закономерностей колонизации фитоплазмы, динамики популяции фитоплазмы в ответ на окружающую среду и взаимодействия фитоплазмы с эндофитами (Bulgari et al., 2011).

### 1.3.3. Серологические методы идентификации

Для обнаружения фитоплазм используют:

1) иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) с использованием моно- (MABs) и поликлональных (PABs) антител. Для анализа используют листья, побеги и корни вегетирующих растений. Для диагностики фитопатогенов методом ИФА разработаны тест-системы компанией «Loewe» (Германия). Преимущество использования метода ИФА – высокая технологичность. Рекомендуется в качестве скринингового теста при тестировании большого количества образцов. При этом полученные результаты должны быть подтверждены молекулярными методами диагностики.

2) иммунофлуоресцентный анализ (ИФ). Растительный материал (диаметром 1 сантиметр, см) фиксируется в течение 7-9 часов в 4%-м растворе параформальдегида в PBS-буфере при температуре 4°C. Из подготовленных образцов готовят ультратонкие срезы (20 микрометров, мкм) с помощью криомикротомы. Полученные срезы инкубируют в течение 30 минут при 4°C в растворе антимышиных антител осла, конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC. Срезы просматривают при длине волны 450-490 нанометров (нм) под флуоресцентным микроскопом. В растениях томатов, зараженных «столбуром» и филлодией бобов, фитоплазмы были подтверждены методом иммунофлуоресценции *in situ* (Cousin et al., 1989). Метод считается трудоемким, поэтому не получил широкого применения для выявления фитоплазм.

При низкой концентрации фитоплазмы в растительных тканях, что часто наблюдается в условиях прохладного климата, возможно получение ложноотрицательных результатов (РМ 7/62 (2), 2017).

Для обнаружения и идентификации возбудителей фитоплазмозов компанией «Bioreba» (Швейцария) разработаны коммерческие наборы для проведения ИФА на основе специфических моноклональных антител, согласно инструкции фирмы-производителя набора. По чувствительности и специфичности метод ИФ малоэффективен по сравнению с ИФА (Brzin et al., 2003; Приходько, Матяшова, 2015; Матяшова, Морозова, 2016).

#### 1.3.4. Молекулярно-генетические методы

Молекулярно-генетические методы позволяют изучать организмы, которые с помощью традиционных методов невозможно исследовать. Важнейшее значение при диагностике фитоплазм имеет качественное выделение их ДНК из тестируемых растительных образцов. Зарубежные ученые В. Kirkpatrick et al. (1987) и U. Ahrens, E. Seemüller (1992) первыми разработали методику выделения ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* из тканей флоэмы растений яблони. Для изолирования клеток фитоплазм и последующего выделения ДНК широко используется методика J.J. Doyle, J.L. Doyle (Doyle, Doyle, 1990; РМ 7/62 (3), 2020), пригодная для выделения ДНК фитоплазм как из насекомых-переносчиков (Marzachi et al., 2005), так и из растительных тканей (Martin et al., 2001). Данная методика была валидирована в европейском межлабораторном ринг-тесте и получила высокую оценку (Torres, 2011).

Для выделения ДНК фитоплазм использую также методики A. Kollar et al. (1990), I. Lee et al. (1991), M. Green et al. (1999), M. Garcia-Chapa et al. (2003), S. Baric et al. (2006), R. Li et al. (2008) и другие. Подавляющее большинство этих методик предполагает использование ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид, СТАВ) в сочетании с экстракцией нуклеиновых кислот смесью фенола и хлороформа и их последующей преципитацией изопропанолом (Приходько, Матяшова, 2015). ДНК фитоплазм, выделенная из растительных тканей по методикам с использованием ЦТАБ, была пригодна для постановки ПЦР после пяти лет хранения в замороженном состоянии (Fránová, 2011).

Для выделения ДНК фитоплазм в зарубежных странах используют коммерческие наборы, такие как «DNeasy Plant Kits» (Qiagen, США), «Extract-N-Amp™ Plant PCR kit» (Sigma, США), «High Pure PCR Template Preparation kit» (Roche, Швейцария) (Heinrich et al., 2001; Bertolini et al., 2007). Ряд исследователей использовали также метод обогащения растительных экстрактов, содержащих фитоплазмы, разработанный учеными U. Ahrens, E. Seemüller (1992) и рекомендованный диагностическим протоколом РМ 7/62 (3) (2020).

Благодаря развитию молекулярной биологии в области фитопатологии стали применять метод ПЦР (полимеразная цепная реакция). Метод основан на многократном копировании искомого участка гена с помощью Taq-полимеразы, пары специфичных праймеров и свободных нуклеотидов. Термостабильный фермент Taq-полимеразы, который был выделен из термостабильных бактерий. Фермент не разрушается до температуры 98°C, максимальная активность при температуре от 65 до 72°C (Heinrich et al., 2001).

ПЦР-анализ состоит из трех стадий: 1) денатурация двуцепочечной ДНК при температуре 92-95°C в течение 10 мин; 2) отжиг праймеров при 4-5°C ниже их температуры плавления, в течение 2-5 мин, при котором происходит восстановление структуры ДНК по принципу комплиментарности; 3) элонгация (синтез) при 72°C, где происходит достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера. Преимущества методов ПЦР заключается в высокой чувствительности метода и его специфичность.

*ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ, PCR real-time).* В реакционную смесь, помимо специфичных праймеров, входят меченые праймеры – зонды. Амплификацию проводят в специальных приборах, состоящих из термоблока для проведения ПЦР и фиксатора сигнала флуоресценции в исследуемом образце. Регистрация результатов осуществляется в качестве графиков (рисунков) и таблиц с наблюдением в реальном времени.

*Вложенную ПЦР (nested)* применяют для наибольшего выхода искомого ампликона. В методе используют две пары праймеров. Первая пара праймеров амплифицирует продукт больше искомого, выбирая его из всей цепи ДНК.

Второй этап ПЦР проводят с другой парой праймеров, которая синтезирует искомый участок гена (Матяшова, 2017). Визуализацию проводят методом геле-электрофореза, основанного на разделении макромолекул на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств.

Для диагностики фитоплазм используют универсальные и специфичные праймеры и зонды, разработанные на фрагменты 16S-23S рРНК гена. Чаще всего используют универсальные праймеры для выявления фитоплазм: P1/P7 (Deng, Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995), fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995), R16F2n/R16R2, R16F2n/R16R2n (Lee et al., 1998), PA2F/PA2R, NPa2F/NPA2R (Heinrich et al., 2001). Для ПЦР-РВ предназначены универсальные системы UniRT (Hren, et al., 2007) и UNI2 (Christensen et al., 2004), видоспецифичные зонды, например, MGB-зонды для видовой идентификации фитоплазм группы Apple proliferation (Mehle et al., 2013). Для более детальной дифференциации видов фитоплазм используют дополнительные филогенетические маркеры – гены рибосомального белка (*rp*), *secY*, *tuf* (IRPCM, 2004) и коммерческие тест-системы отечественного и зарубежного производителя.

*ПДРФ-анализ (анализ длин рестрикционных фрагментов, RFLP)*. Метод применяют для дифференциации близкородственных видов, а также определения видовой принадлежности фитоплазм. С помощью ферментов рестрикции определяют количество искомым участков генов исследуемого образца.

На сегодняшний день одним из наиболее точных методов является *расшифровка нуклеотидной последовательности (метод секвенирования)*. Секвенирование (от англ. «sequence» – последовательность) – это этап расшифровки нуклеотидной последовательности, приобретенной при постановке ПЦР с мечеными нуклеотидами. Идентификация микроорганизма осуществляется по набору азотистых оснований А, G, T, C на участке гена, после сравнения последовательностей, депонированных в генетической базе данных. К концу 1960 года Ф. Сэнгер разработал метод расшифровки нуклеотидных последовательностей РНК, получаемой с ДНК-матрицы при помощи РНК-полимеразы. В своей работе Сэнгер использовал меченные атомы, что позволило

ему работать с ничтожно малым количеством экспериментального материала – микрограммами. В 1976 году А. Максам и У. Гилберт предложили метод секвенирования – метод химической деградации, который был основан на специфической химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченого с одного конца. В 1977 году Сэнгер предложил еще один способ ферментативного секвенирования – метод терминаторов (терминирующих аналогов трифосфатов). Несколько измененный метод используется и в настоящее время. Метод секвенирования проводят на генетических анализаторах методом капиллярного электрофореза (Schneider et al., 1997; Heinrich et al., 2001; Костюк, 2017; Бондаренко, Белкин, 2018; Зорина, 2019).

## Глава II. Материалы и методы

### 2.1. Материалы исследований

В работе объектами исследования были фитоплазмы из групп Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) и Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*). В экспериментах изучали коллекцию ДНК микроорганизмов и ДНК растительных культур из ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), ООО «Синтол», ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ФГБНУ «ВНИИФ»), Испанского института сельскохозяйственных исследований IVIA (Institut Valencia d'Investigacions Agraries) с целью отработки методов молекулярно-генетической диагностики (табл. 1). Хранение ДНК микроорганизмов осуществляли при температуре в пределах от минус 20 до минус 80°C.

Для изучения специфичности олигонуклеотидов и тест-систем в работе использовали ДНК некоторых особо опасных видов фитопатогенных бактерий (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.; *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin; *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* Wells et al.), а также ДНК неинфицированных растений-хозяев (*Malus domestica* Borkh., *Pyrus communis* L.; *Prunus armeniaca* L.; *Vitis vinifera* L.).

Исследования отечественного и зарубежного растительного материала *Malus* spp., *Pyrus* spp., *Cydonia oblonga* L., *Vitis vinifera* L., *Prunus* spp., *Solanum* spp. и других видов растений на наличие и изучение видового состава фитоплазм проводили в период с 2018 по 2021 гг.

Экспериментальные исследования проводили на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» в научно-методическом отделе вирусологии и бактериологии, в испытательном лабораторном центре, в ООО «Синтол» Центр коллективного пользования ВНИИСБ «Биотехнология», а также на кафедре биохимии имени академика Березова Т.Т. ФГАОУ ВО «Российский

университет дружбы народов в соответствии с нормативными документами, используемыми в научно-практической деятельности организаций.

Таблица 1 – ДНК культур, используемых в работе

№ п/п	Название микроорганизма	Источник (коллекция)	Зараженный растительный материал
1	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>	Материалы IVIA, Испания	<i>Malus domestica</i> Borkh.
2	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>	Материалы Бондаренко Г.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Malus</i> spp.
3	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>	Материалы IVIA, Испания	<i>Pyrus communis</i> L.
4	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>	Материалы Бондаренко Г.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Pyrus communis</i> L.
5	<i>Candidatus Phytoplasma prunorum</i>		<i>Prunus armeniaca</i> L.
6	<i>Candidatus Phytoplasma prunorum</i>	Материалы Башкировой И.Г., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Prunus persica</i> L.
7	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	Материалы ООО «Синтол»	<i>Vitis vinifera</i> L.
8	<i>Candidatus Phytoplasma rubi</i>	Материалы Бондаренко Г.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Rubus idaeus</i> L.
9	<i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i>	Материалы ФГБНУ «ВНИИФ»	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
10	<i>Candidatus Phytoplasma convolvuli</i>	Материалы Башкировой И.Г., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
11	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>		<i>Barbarea vulgaris</i> W.T.Aiton
12	<i>Erwinia amylovora</i> (штамм CFBR1430)	Материалы Писаревой И.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Crataegus oxyacantha</i> L.
13	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>		-
14	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i> (штамм CFBR8082)		Чистая культура
15	Неинфицированный материал	Материалы Башкировой И.Г., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Malus domestica</i> Borkh.
16	Неинфицированный материал		<i>Pyrus communis</i> L.
17	Неинфицированный материал		<i>Prunus armeniaca</i> L.
18	Неинфицированный материал		<i>Vitis vinifera</i> L.

## 2.2. Сбор зараженного растительного материала

Биоматериал получен при проведении обследований территорий Российской Федерации и зарубежных стран при анализе посадочного материала

для определения фитосанитарного состояния подкарантинной продукции в ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» и в ходе научных исследований.

Сбор растительного материала проводили при визуальном осмотре на наличие симптомов, характерных для заражения фитоплазмами из групп *Apple proliferation* (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) и *Stolbur* (*Candidatus Phytoplasma solani*).

Учитывая неравномерное распределение патогена по растениям, для тестирования отбирали сборные образцы из листьев, побегов и корневой системы. Собранный растительный материал хранили при температуре в пределах от 2 до 8°C в пакетах с замком Zip Lock и фильтровальной бумагой (бумажными салфетками) для устранения излишнего конденсата. Более длительное хранение образцов осуществляли при температуре от минус 20 до минус 80°C (МСФМ 27, 2018).

Перед проведением исследований по видовой диагностике фитоплазм тщательно и корректно осуществляли формирование аналитической пробы из среднего образца. Подготовка образцов заключалась в извлечении фрагментов проводящих тканей из растительного материала. При проведении исследований проводили обработку рабочих инструментов (скальпелей, ножниц) и рук в перчатках хлорсодержащим дезинфицирующим средством, согласно рекомендациям производителя, после каждого растительного материала для предотвращения контаминации между исследуемыми образцами.

## **2.3. Молекулярно-генетические методы идентификации фитоплазм из групп *Apple proliferation* и *Stolbur***

### **2.3.1. Подготовка проб к анализу и выделение ДНК**

Концентрация клеток фитопатогенных микроорганизмов в растительном экстракте подвержена значительным колебаниям в зависимости от сезона, поэтому, важно получить ДНК в достаточно высокой концентрации и чистоте для точного анализа фитопатогенов. Одной из задач данной работы является поиск современных и более перспективных методов экстракции ДНК фитоплазм для

оптимизации рабочего процесса при диагностике растительных патогенов с помощью отечественных и зарубежных реактивов. Проводили сравнение эффективности различных методов экстракции нуклеиновых кислот.

Выделение ДНК фитоплазм по методике Doyle & Doyle (Doyle, Doyle, 1990) принято считать классическим методом (PM 7/133 (1), 2018; PM 7/62 (3), 2020), но он является трудоемким и ресурсозатратным. Помимо стандартной методики, в работе использовали 6 различных готовых наборов реагентов отечественного и зарубежного производства для экстракции ДНК микроорганизма из растительного материала.

Для подготовки проб биоматериала для экстракции ДНК использовали гомогенизирование в керамической ступке с пестом. В качестве альтернативного метода пробоподготовки использовали автоматическую гомогенизацию с применением гомогенизатора лопаточного типа BagMixer 400 W (Interscience, Франция) с применением пакетов для гомогенизации с фильтром объемом 400 миллилитров (мл) BagFilter с боковым фильтром (диаметр пор <250 мкм) (Interscience, Франция). На первых этапах исследования мы использовали керамические ступки для гомогенизации, а в дальнейшем использовали исключительно автоматический гомогенизатор лопаточного типа BagMixer 400 W.

Дополнительно в каждой серии выделений нуклеиновых кислот использовали отрицательный контроль выделения (К-в), который необходим для контроля загрязнения во время экстракции и последующей амплификации. Контроль может быть представлен неинфицированной матрицей растения-хозяина или чистым буфером на этапе подготовки аналитических проб (образцов) (МСФМ 27, 2018).

Для отработки методов выделения ДНК использовали заведомо известный зараженный фитоплазмой *Candidatus Phytoplasma pyri* (группа Apple proliferation) растительный материал *Pyrus communis* L. Локализация фитоплазм осуществляется по проводящим тканям растения, следовательно, апробация методов выделения нуклеиновых кислот может проводиться на любом

представителе из рода *Candidatus Phytoplasma* spp. (Каримова и др., 2018; Namba, 2019).

В дальнейших исследованиях использовали проанализированные наборы реагентов «ЦитоСорб» и «Сорб-ГМО-Б» для выделения ДНК фитоплазм из зараженного биоматериала.

### 2.3.1.1. Методика Doyle & Doyle

Подготовка образцов для исследований по модифицированной методике Doyle & Doyle (Doyle, Doyle, 1990; Матяшова, Морозова, 2016; РМ 7/62 (2), 2017) заключалась в извлечении фрагментов проводящих тканей из растительного материала. Навеску от 0,5 до 1,5 грамм (г) ткани из разных частей растения (жилки, корни и др.) измельчали и растирали пестом в керамической ступке в предварительно размороженном разрушающем буфере (Grinding buffer), в следующем расчете на навеску: 0,5 г образца – 15 мл данного буфера; 1,0 г – 30 мл; 1,5 г – 45 мл. Состав буфера представлен в приложение В. Ступки предварительно охлаждали в морозильной камере.

Дальнейшее изолирование ДНК фитоплазм проводилось следующим образом.

1. Переносили полученный экстракт в макроцентрифужные пробирки (макропробирки) объемом 50 мл, центрифугировали на центрифуге с охлаждением Allegra X-30R (Beckman Coulter, США) при условиях: 5700 оборотов в минуту (об/мин) в течение 5 минут при температуре 4°C.

2. Полученный супернатант (надосадочную жидкость) переливали в другие макропробирки, и центрифугировали при условиях: 9500 об/мин в течение 25 минут при  $t = 4^{\circ}\text{C}$ ; удаляли надосадочную жидкость. Извлеченный осадок содержал нуклеиновые кислоты фитоплазм. Хранение его возможно в течение суток при  $t^{\circ}$  в пределах от 2°C до 8°C.

3. К полученному осадку добавляли 1 мл (1000 мкл) экстрагирующего буфера (СТАВ buffer), тщательно перемешали смесь на центрифуге-вортексе ELMi V-3 SkyLine (ELMI, Латвия) при 2400 об/мин. Состав буфера показан в

приложении В. Далее переносили полученную смесь в пробирки объемом 1,5-2,0 мл и инкубировали в термостате Гном (ДНК-Технология, Россия) при температуре 60°C в течение 30 минут.

4. После добавляли 1 мл смеси хлороформа и изоамилового спирта (в соотношении v:v 24:1) на один исследуемый образец, тщательно перемешивали содержимое на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия). Эмульсия имела две жидкие фазы. Центрифугировали пробирки при 13000 об/мин в течение 10 минут на мини-центрифуге Microspin 12 (BioSan, Латвия).

5. Верхнюю водную фазу вносили в пробирки объемом 1,5-2 мл, добавляли 1 мл изопропанола на каждый исследуемый образец, охлажденного до минус 20°C. Тщательно перемешивали содержимое пробирок на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 до однородного состояния и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут. Полученный супернатант осторожно удаляли, а осадок в дальнейшем использовали.

6. К полученному осадку добавляли 1 мл 70% этанола (охлажденного до минус 20°C) на каждый исследуемый образец, перемешивали с осадком. Повторно центрифугировали пробирки при 13000 об/мин в течение 5 минут на мини-центрифуге, сливали надосадочную жидкость и высушивали открытые пробирки в термостате при температуре 60°C до полного испарения спирта.

7. К подсушенному осадку добавляли 100 мкл элюирующего буфера (TE-буфер или деионизированную воду) на каждый исследуемый образец, тщательно перемешивали на центрифуге-вортексе Microspin FV-2400 и инкубировали 10-15 минут при температуре 60°C.

### **2.3.1.2. Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb»**

Принцип действия отечественного набора реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb», Каталог № EW-001 компании ООО «Синтол» основан на лизисе супернатанта в присутствии гидрохлорида гуанидина (GuHCl) с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на кремниевых частицах в присутствии высокой концентрации солей натрия.

Предварительную подготовку образца проводили следующим образом: в керамическую ступку вносили 500 миллиграмм (мг) растительного материала и 3 мл экстрагирующего буфера. Гомогенизацию образца проводили в керамической ступке до получения однородной массы, переносили 1 мл гомогенного образца из ступки в пробирки объемом 1,5 мл. Инкубировали гомогенат 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе ТЭТА 2 (Биоком, Россия). Центрифугировали на мини-центрифуге при 5000 об/мин 5 минут.

Далее вносили по 500 мкл образцов в новые пробирки и добавляли в каждую пробирку по 150 мкл лизирующего раствора. Перемешивали пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировали при 65°C 5 минут в термостате Термо 48 (Биоком, Россия), перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту. Пробирки охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали пробирки при 13000 об/мин 5 минут на центрифуге СМ-50МР (ELMI, Латвия).

Далее, смешали по 950 мкл осаждающего буфера из набора и по 50 мкл сорбирующего раствора на исследуемый образец в чистых пробирках объемом 2 мл (в комплекте). После центрифугирования в подготовленную смесь добавляли по 500 мкл исследуемого образца. Интенсивно перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировали в термостате при  $t=65^{\circ}\text{C}$ . Вносили в каждую пробирку 500 мкл осаждающего раствора для сорбции нуклеиновых кислот и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Центрифугировали пробирки на центрифуге СМ-50МР при 4000 об/мин 1 минуту. Не задевая осадок, удаляли супернатант.

К осадку добавляли по 800 мкл промывочного раствора 1, центрифугировали 1 минуту на центрифуге СМ-50МР при 4000 об/мин. Затем удаляли супернатант и вносили промывочный раствор 2, также центрифугировали 1 минуту при 4000 об/мин. Повторяли еще раз действия с промывочными растворами 1 и 2.

Инкубировали исследуемые образцы в термостате при  $t=65^{\circ}\text{C}$  10 минут и добавляли 100 мкл элюирующего буфера из набора. Инкубировали в термостате еще 10 минут и центрифугировали на центрифуге СМ-50МР при 13000 об/мин 3 минуты. В другие пробирки объемом на 1,5 мл вносили по 80 мкл образца. Далее использовали выделенную ДНК для постановки ПЦР.

### **2.3.1.3. Набор реагентов «СОРБ-ГМО-Б»**

Принцип действия набора реагентов «СОРБ-ГМО-Б», Каталог № GM-503-50 (ООО «Синтол», Россия) состоит в лизисе надосадочной жидкости в присутствии ионного детергента ЦТАБ (цетил-триметиламмония бромид), и в дальнейшей депротеинизации хлороформом ( $\text{CHCl}_3$ ) с последующим осаждением нуклеиновых кислот на кремниевый сорбент в присутствии солей гуанидина.

Предварительная подготовка образцов: в керамическую ступку вносили 200 мг растительного материала и 2 мл лизирующего буфера из набора. Гомогенизировали образец, затем переносили 1 мл его в пробирки объемом на 1,5 мл. Инкубировали образец 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия). Центрифугировали на центрифуге СМ-50МР (ELMI, Латвия) при 8000 об/мин 5 минут, далее переносили по 800 мкл исследуемого образца в лизирующем буфере в другие пробирки объемом 1,5 мл и добавляли по 15 мкл фермента (протеиназа К). Тщательно перемешивали и инкубировали в термостате Гном (ДНК-Технология, Россия) в течение 60 минут при температуре  $60^{\circ}\text{C}$ , перемешивали пробирки через каждые 15 минут. Далее центрифугировали исследуемые образцы на центрифуге СМ-50МР в течение 5 минут при 13000 об/мин.

В пробирки объемом 1,5 мл переносили верхнюю водную фазу в количестве 600 мкл и добавляли по 500 мкл экстрагирующего раствора с содержанием хлороформа, перемешали на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400, центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин.

Для проведения этапа сорбции и осаждения ДНК смешивали по 600 мкл осаждающего буфера из набора и по 25 мкл сорбента в пробирках объемом 1,5 мл. Верхнюю водную фазу переносили в подготовленные пробирки в количестве 300 мкл. Интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут. Центрифугировали на центрифуге СМ-50МР в течение 1 минуты при 7000 об/мин. Затем, удаляли супернатант.

Промывку образцов осуществляли тремя промывочными растворами, входящими в набор. Для первой промывки использовали раствор под названием «промывочный раствор А» в количестве 500 мкл на образец, тщательно перемешивали и центрифугировали на центрифуге СМ-50МР в течение 30 секунд при 7000 об/мин, затем удаляли надосадочную жидкость. Далее, проделывали повторно и с растворами под названиями «промывочный раствор Б» и «промывочный раствор В».

Для удаления промывочных растворов и полного высыхания сорбента, пробирки с открытыми крышками помещали в термостат при температуре 60°C в течение 5 минут. Затем добавляли по 200 мкл элюирующего раствора, тщательно перемешивали и еще раз инкубировали в термостате при  $t=60^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут. Центрифугировали пробирки на центрифуге СМ-50МР 2 минуты при 13000 об/мин. Затем переносили по 150 мкл исследуемого образца в чистые пробирки объемом 1,5 мкл, которые использовали для постановки ПЦР.

#### **2.3.1.4. Набор реагентов «ФитоСорб»**

В наборе реагентов «ФитоСорб», Каталог № РН-520 (ООО «Синтол», Россия) использовали буфер под названием «экстрагирующий», разрушающий клеточные мембраны. Дальнейшее выделение ДНК осуществляли с лизиса супернатанта в присутствии гуанидин тиоцианата (GuSCN) и осаждении нуклеиновых кислот на магнитный сорбент в присутствии спиртов.

Пробоподготовка образцов перед выделением заключалась в получении водной гомогенной суспензии. Для гомогенизации в керамические ступки

вносили 600 мг образца и добавляли 5 мл экстрагирующего буфера, входящего в состав набора реагентов. После получения однородной массы перенесли 1 мл образца в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали на мини-центрифуге Microspin 12 (BioSan, Латвия) 4000 об/мин в течение 5 минут.

Далее, переносили по 700 мкл в пробирки на 1,5 мл и добавляли по 500 мкл лизирующего раствора. Интенсивно перемешивали и инкубировали в термостате Гном (ДНК-Технология, Россия) при 65°C в течение 10 минут. Центрифугировали исследуемые образцы на мини-центрифуге Microspin 12 при 13000 об/мин в течение 5 минут.

В пробирки переносили по 600 мкл супернатанта, добавляли по 60 мкл сорбирующего раствора и по 500 мкл осаждающего раствора. Тщательно перемешивали и центрифугировали на мини-центрифуге Microspin 12 в течение 1 минуту при 4000 об/мин.

Устанавливали на магнитный штатив, удаляли супернатант и добавляли по 500 мкл промывочного раствора 1. Перемешивали и центрифугировали снова на мини-центрифуге Microspin 12 при 4000 об/мин 1 минуту. Для промывки ДНК повторяли те же действия снова.

Далее добавляли по 300 мкл промывочного раствора 2, тщательно перемешивали и центрифугировали 4000 об/мин 1 минуту. Аккуратно удаляли супернатант и инкубировали пробирки с открытыми крышками 10 минут до полного испарения промывочных растворов в термостате при 65°C.

Вносили в пробирки по 120 мкл элюирующего раствора, тщательно перемешивали и инкубировали в термостате при 65°C в течение 5 минут. Центрифугировали на мини-центрифуге Microspin 12 при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Устанавливали в магнитный штатив и переносили по 100 мкл супернатанта в пробирки объемом 1,5 мл. Раствор с ДНК использовали для проведения молекулярно-генетических методов.

### **2.3.1.5. Комплект реагентов «Проба-ГС»**

Действие комплекта реагентов для выделения ДНК «Проба-ГС», Каталог № Р-091/2 (ООО «АгроДиагностика», Россия) основано на использовании для лизиса клеток гуанидин тиоцианат (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на кремниевом сорбенте с диатомовой землей. Подготовка анализируемого образца: в керамическую ступку вносили 200 мг растительного материала и 200 мкл лизирующего буфера, гомогенизировали и переносили полученный образец из ступки в пробирки на 1,5 мл.

Далее добавляли смесь из 150 мкл лизирующего раствора и 20 мкл ресуспензированного сорбента. Пробирки инкубировали в термостате Термо 48 (Биоком, Россия) в течение 20 минут при температуре 50°C, затем центрифугировали на центрифуге СМ-50МР (ELMI, Латвия) 1 минуту при 13000 об/мин.

Удаляли надосадочную жидкость и добавляли по 200 мкл промывочного раствора 1. Перемешивали содержимое пробирки и центрифугировали на центрифуге СМ-50МР при 13000 об/мин 1 минуту. Повторяли предыдущий шаг, только с промывочным раствором 2 и с промывочным раствором 3.

Пробирки с осадком с открытыми крышками инкубировали в термостате Термо 48 в течение 5 минут при температуре 50°C. Добавляли к осадку по 100 мкл элюирующего раствора, перемешивали и инкубировали в термостате 5 минут при 50°C.

Центрифугировали пробирки на центрифуге СМ-50МР при 13000 об/мин 1 минуту. Переносили надосадочную жидкость в пробирки объемом 1,5 мл. Полученный раствор использовали для ПЦР.

### **2.3.1.6. Комплект реагентов «Проба-НК»**

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительной ткани «Проба-НК», основан на лизисе супернатанта с последующим тотальным осаждением нуклеиновых кислот спиртами. Подготовка пробы: вносили по 200 мг

растительного материала и 400 мкл лизирующего буфера в керамическую ступку. Гомогенизировали образец и переносили гомогенат в количестве 200 мкл в пробирки объемом 1,5 мл (Каталог № P-090/2, ООО «АгроДиагностика»).

Добавляли по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировали в термостате Термо 48 (Биоком, Россия) в течение 20 минут при 65°C. Центрифугировали пробирки на центрифуге CM-50MP (ELMI, Латвия) в течение 10 минут при 2000 об/мин.

Переносили в пробирки по 300 мкл надосадочной жидкости и добавляли по 300 мкл реагента для преципитации, встряхивали на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия). Центрифугировали на центрифуге CM-50MP в течение 15 минут при 13000 об/мин.

Удаляли надосадочную жидкость и добавляли по 500 мкл буфера под названием «промывочный раствор 1» к полученному осадку. Центрифугировали в течение 5 минут 13000 об/мин. Затем, снова удаляли надосадочную жидкость и добавляли по 300 мкл буфера под названием «промывочный раствор 2» к осадку, повторно центрифугировали при 13000 об/мин 5 минут.

Супернатант удаляли и инкубировали пробирки с осадком с открытыми крышками в термостате в течение 5 минут при температуре 65°C. Затем добавляли по 100 мкл буфера из набора для растворения осадка, перемешивали и инкубировали в термостате при  $t=65^{\circ}\text{C}$  10 минут.

Раствор встряхивали и осаждали на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400. Полученный раствор использовали для постановки ПЦР.

### **2.3.1.7. Набор «DNeasy Plant Mini Kit»**

Набор для выделения ДНК из растений и грибов «DNeasy Plant Mini Kit», Каталог № 69104 (Qiagen, США) основан на лизисе клеток гуанидином тиоционатом (GuSCN), с последующей сорбцией нуклеиновых кислот в спин-колонке на мембране из диоксида кремния. Предварительную подготовку образца проводили согласно рекомендациям производителя: для этого в керамическую ступку вносили 100 мг растительного материала и добавляли 500 мкл

лизирующего раствора (Buffer AP1). Гомогенизировали образец до получения однородной массы.

Далее переносили 400 мкл гомогенного образца из ступки в пробирки на 1,5 мл и добавляли 4 мкл РНКазы. Перемешивали на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия) и инкубировали в термостате Гном (ДНК-Технология, Россия) при температуре 65°C в течение 10 минут. Во время инкубации переворачивали пробирку 2 раза.

Затем добавляли по 130 мкл осаждающего буфера (Buffer P3). Перемешивали и инкубировали 5 минут в холодильной камере при температуре в пределах от 2 до 8°C. Центрифугировали полученный раствор на мини-центрифуге Microspin 12 (BioSan, Латвия) 14000 об/мин в течение 5 минут. Переносили весь объем смеси в спин-колонку (QIAshredder) на 2 мл, которые прилагаются в комплекте. Центрифугировали в течение 2 минут при 14000 об/мин.

Далее, к полученному раствору добавляли 1,5 объема промывочного буфера (Buffer AW1) и перемешивали пипетированием. Полученный раствор в количестве 650 мкл переносили в новую спин-колонку и центрифугировали в течение 1 минуты при 8000 об/мин. Повторили еще раз данный этап.

После повторного центрифугирования, спин-колонку помещали в новую пробирку объемом на 2 мл и добавляли 500 мкл промывочного буфера (Buffer AW2). Полученный раствор центрифугировали течение 1 минуты при 8000 об/мин. После, спин-колонку помещали в новую пробирку объемом на 2 мл и добавляли 500 мкл промывочного буфера (Buffer AW2). Центрифугировали 2 минуты при 14000 об/мин.

Далее, спин-колонку помещали в новую пробирку объемом 1,5-2 мл и добавляли 100 мкл элюирующего буфера (Buffer AE). Инкубировали 5 минут при комнатной температуре и центрифугировали 1 минуту при 8000 об/мин. Данный этап осуществляли два раза.

Полученный раствор использовали для постановки ПЦР.

### 2.3.2. Применение метода ПЦР для идентификации фитоплазм

После определения оптимального метода выделения ДНК, в экспериментах проводили отработку и оптимизацию методов диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) и из группы Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на положительных образцах.

В исследованиях использовали олигонуклеотиды (праймеры и зонды), разработанные на участок 16S-23S гена рРНК и межгенный участок 16S-23S гена. Олигонуклеотиды синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Россия) и предоставлены в лиофилизированном виде. Разведение праймеров до концентрации 100 пикомоль/мкл ( $\text{pmol}/\mu\text{l}$ ) проводили согласно паспорту олигонуклеотидов. Рабочая концентрация для праймеров составляла 10 пикомоль/мкл, для зондов – 5 пикомоль/мкл (Бондаренко, Башкирова, 2020).

Для оптимизации проведения метода ПЦР, в работе использовали несколько готовых наборов реагентов (готовая реакционная смесь или микс для ПЦР или mix) отечественных производителей (табл. 2).

Для подтверждения отсутствия ложноотрицательного результата при постановке ПЦР в реальном времени использовали внутренний положительный контроль по каналу флуоресценции HEX (R6G), синтезированный компанией ООО «Синтол».

Состав реакционной смеси для ПЦР рассчитывали на количество исследуемых образцов и на контроли (см. стр. 58-62). При проведении амплификаций использовали отрицательный контрольный образец без добавления ДНК при приготовлении реакционной смеси (К-ч или К-Н<sub>2</sub>О) или отрицательный контрольный образец без внесения образца при выделении ДНК микроорганизма (К-в) для оценки прохождения реакции и получения достоверных результатов экспериментов. Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на приборах DТprime (ДНК-Технология, Россия) и CFX-96 (Bio-

Rad, США). Для классической и вложенной ПЦР – Veriti и SimpliAmp (Applied Biosystems, США).

В работе по диагностике фитоплазм из групп Apple proliferation с помощью метода ПЦР, проводили изучение аналитических характеристик олигонуклеотидов (специфичность и чувствительность), разработанных на участки 16S-23S рРНК гена. Определение аналитических характеристик необходимо для апробации олигонуклеотидов.

Для определения чувствительности олигонуклеотидов проводили серию последовательных разведений известного положительного образца фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (группа Apple proliferation) и *Candidatus Phytoplasma* (группа Stolbur). Серия разведений состояла из 10-кратных разведений образца от  $10^{-1}$  (1/10) до  $10^{-7}$  (1/10000000) в 2 повторностях.

Для оценки специфичности олигонуклеотидов использовали ДНК заведомо известных положительных образцов фитоплазм и сопутствующих организмов, описанных в разделе 2.1. Специфичность олигонуклеотидов необходимо изучать для предотвращения образования неспецифичных продуктов амплификации, которые могут оцениваться как ложноположительный результат, и для снижения потери чувствительности реакции ПЦР (Зорина, 2019).

Таблица 2 – Реакционные смеси (миксы для ПЦР), использованные в работе

№ п/п	Наименование	Состав
<b>ЗАО «Евроген», Россия</b>		
1	5X qPCRmix-HS	Тaq ДНК полимеразa со специфическими моноклональными антителами, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), Mg <sup>2+</sup> , ПЦР-буфер. В 1x смеси концентрация магния 3 mM, каждого dNTP 0,12 mM
2	5X qPCRmix-HS + high ROX	HS Тaq ДНК полимеразa, краситель ROX, смесь dNTP, Mg <sup>2+</sup> , буфер. В 1x смеси конц. магния 3 mM, каждого dNTP 0,12 mM
3	5X qPCRmix-HS (UDG)	Тaq ДНК-полимеразa с «горячим стартом», UDG G (урацил-ДНК-гликозилаза), смесь dNTP (включая dUTP в оптимальной пропорции), ионы Mg <sup>2+</sup> , ПЦР буфер. В 1x реакционной смеси концентрация магния 3 mM, концентрация dATP, dGTP, dCTP – 0.12 mM, dTTP/dUTP – 0.06 mM
4	5X ScreenMix	Тaq ДНК полимеразa, смесь dNTP, Mg <sup>2+</sup> , ПЦР буфер, красители. В 1x реакционной смеси концентрация магния 2 mM, концентрация каждого dNTP 0.12 mM
5	5X ScreenMix-HS	Тaq ДНК полимеразa, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg <sup>2+</sup> , ПЦР буфер, красители. В 1x реакционной смеси концентрация магния 3 mM, концентрация каждого дезоксинуклеозидтрифосфата 0.12 mM
<b>ЗАО «Диалат Лтд», Россия</b>		
6	5X Mas <sup>CFG</sup> Taq Mix-2025	2,5U SmarTaq полимеразa, смесь dNTP – 200μM каждого, Реакционный буфер с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub> – 2.0mM стабилизаторы
7	5X Mas <sup>CFE</sup> Taq Mix-2025	SmarTaq полимеразa, смесь dNTP – 200μM каждого, буфер с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> – 2.0Mm, стабилизатор/энхансер
8	5X Mas <sup>DD</sup> Taq Mix-2025	SmarTaq полимеразa, смесь dNTP – 200 μM каждого, буфер с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> – 2,0 mM, два красителя (красный+оранжевый), стабилизатор
9	5X Mas <sup>OR</sup> Taq Mix-2025	SmarTaq полимеразa, смесь dNTP – 200μM каждого, буфер с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> – 2.0mM, краситель (оранжевый), стабилизатор/энхансер
10	5X Mas <sup>XCT</sup> Taq Mix-2025	SmarTaq полимеразa, смесь dNTP – 200μM каждого, буфер с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> – 2.0mM, краситель (синий), стабилизатор
11	5X Mas <sup>RGT</sup> Taq Mix-2025	2,5U SmarTaq полимеразa, смесь dNTP – 200μM каждого, буфер с (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> – 2.0mM, два красителя (малиновый+оранжевый), стабилизатор
<b>ООО «Синтол», Россия</b>		
12	2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green (Каталог № M-439)	2,5-кратная полностью готовая реакционная смесь, содержащая ПЦР-буфер; смесь dNTP, MgCl <sub>2</sub> , Тaq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами и интеркалирующий агент EVA Green

Визуализацию всех результатов амплификаций классической и вложенной ПЦР проводили с помощью гель-электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, с добавлением интеркалятора бромистый этидий. Использовали камеры для проведения гель-электрофореза в комплекте с источником питания фирмы-производителя «ДНК-Технология», «Хеликон» (Россия) с соблюдением следующих условий: 140 миллиампер (мА), 115 ватт (В) и 40 вольт (Вт) в течение 1 часа 15 минут.

Получение электрофореграмм проводили с помощью системы видеодокументации «Molecular Imager Gel Doc XR» с трансиллюминатором (Bio-Rad, США). Размер продуктов амплификации определяли относительно маркера молекулярного веса (маркер длины продукта ПЦР) DNA LADDER SM0323 с диапазоном 100-3000 пар нуклеотидов (п.н.) (Thermo Fisher Scientific, США).

### 2.3.2.1. Универсальная диагностика фитоплазм

#### ПЦР в реальном времени

Для выявления фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur использовали универсальный тест **UNI2** (UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe), который был разработан Christensen et al. (2004), а описание теста было опубликовано Christensen et al. (2013). Зонд и праймеры были основаны на выравнивании 16S рРНК гена, полученной в базе данных NCBI из ряда штаммов фитоплазм (по одному представителю из групп 16Sr), бактерий и микоплазм (PM 7/62 (2), 2017):

UNI2-F: 5`-CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA-3`

UNI2-R: 5`-TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA-3`

UNI2-probe: 5`-ROX-TGACGGGACTCCGCACAAGCG-BHQ2-3`.

Состав реакционной смеси для постановки ПЦР с использованием олигонуклеотидов UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe на один образец представлен в таблице 3. Программа амплификации для теста UNI2 составила: первичная денатурация при 95°C в течение 10 минут; повторная реакция в течение 45 циклов: денатурация при 95°C – 15 секунд; отжиг при 60°C – 1 минута. Флуоресцентная метка зонда ROX – специфика, ВПК – HEX.

Таблица 3 – Состав реакционной смеси на один образец

№ п/п	Наименование реактива	Тест UNI2 (объем, мкл)
1	Реакционная смесь (Mix)	5
2	Деионизированная вода	15,5
3	Прямой праймер (F)	1
4	Обратный праймер (R)	1
5	Зонд (probe, P)	0,5
6	Тотальная экстрагированная ДНК	2
7	Внутренний положительный контроль (ВПК)	0,1
Общий объем смеси на 1 образец		25

### Классическая и вложенная ПЦР

Для диагностики микроорганизмов из групп *Apple proliferation* и *Stolbur* использовали универсальные праймеры **P1** (Deng and Hiruki, 1991)/**P7** (Schneider et al., 1995). Данную пару праймеров использовали в качестве первого этапа вложенной ПЦР, которые амплифицируют всю длину 16S гена, межгенный спейсер 16S-23S и небольшую часть гена 23S рРНК (около 1800 п.н.) (МСФМ 27, 2018; РМ 7/62 (3), 2020):

P1: 5`-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3`

P7: 5`-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3`.

Для проведения ПЦР использовали следующий состав реакционной смеси на один образец: реакционная смесь (mix) – 5 мкл; деионизированная вода – 14,5 мкл; пара P1/P7 по 1,5 мкл каждого; тотальная ДНК – 2,5 мкл. Общий объем равен: 25 мкл.

Программу амплификации для первого этапа вложенной ПЦР с парой праймеров P1/P7 использовали следующую: 1) 95°C – 5 мин; 2) повторная реакция в течение 35 циклов: 94°C – 1 мин; 52°C – 2 мин, 72°C – 2 мин 30 сек; 3) 72°C – 5 мин.

Далее, в качестве второго этапа вложенной ПЦР, использовали универсальные праймеры **fU5** (5`-CGGCAATGGAGGAAACT-3`)/**rU3** (5`-TTTCAGCTACTCTTTGTAACA-3`) (Lorenz et al., 1995), разработанные на часть 16S рРНК гена (РМ 7/62 (3), 2020). Продукт амплификации равен около 950 п.н.

После проведения первого этапа вложенной ПЦР, ампликоны (полученные продукты амплификации) разводили в деионизированной воде (1:30 соответственно). Для второго этапа разведенный ампликон (продукт амплификации 1 этапа) добавляли в реакционную смесь для проведения второго этапа вложенной ПЦР.

Для оптимизации второго этапа вложенной ПЦР осуществляли подбор оптимальной температуры отжига пары праймеров fU5/rU3. В экспериментах использовали состав реакционной смеси и оптимизированную программу амплификации, представленные в таблице 4.

Таблица 4 – Условия проведения вложенной ПЦР с праймерами fU5/ rU3

Состав реакционной смеси			Программа амплификации			
№ п/п	Наименование реактива	Объем, мкл	Условия*	T, °C	t, мин	Ct
1	Реакционная смесь (Mix)	5	<b>Первичная денатурация</b>	95	5:00	1
2	Деионизированная вода	14,5	<b>Денатурация</b>	94	0:30	35
3	fU5	1,5	<b>Отжиг</b>	57	0:30	
4	rU3	1,5	<b>Элонгация</b>	72	0:50	
5	Продукт амплификации 1 этапа (1:30)	2,5	<b>Финальная элонгация</b>	72	5:00	1
Общий объем смеси на 1 образец		25	Примечание: T, °C – температура в градусах Цельсия; t, мин – время в минутах; Ct – количество циклов.			

Универсальные праймеры fU5/rU3 можно использовать в качестве самостоятельной пары для проведения классической ПЦР, но чувствительность метода при этом уступает вложенной ПЦР.

### 2.3.2.2. Идентификация фитоплазм из группы *Apple proliferation*

Для дифференциации близкородственных видов фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri* и *Candidatus Phytoplasma prunorum*, авторы Nikolic et al. (2010) и Mehle et al. (2013), рекомендуют использовать **специфичные праймеры (F/R)** для группы *Apple proliferation* и

видоспецифичные MGB-зонды (AP-specific probe; PD-specific probe; ESFY-specific probe), разработанные на участок гена 16-23S рРНК (PM 7/62 (3), 2020):

Forward primer (F): 5`-TGGTTAGAGCACACGCCTGAT-3`

Reverse primer (R): 5`-TCCAСТGTGCGCCСТТААТТ-3`.

Для проверки работы праймеров F/R в работе использовали реакцию смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green отечественного производства (табл. 2). Для проведения ПЦР использовали состав реакционной смеси, представленный в таблице 5.

Таблица 5 – Состав реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green

№ п/п	Наименование реактива	F/ R (объем, мкл)
1	Реакционная смесь (Mix)	10
2	Деионизированная вода	9,4
3	Прямой праймер (F)	0,05
4	Обратный праймер (R)	0,05
5	Тотальная экстрагированная ДНК	2
6	SynTaq ДНК-полимераза	0,5
Общий объем смеси на 1 образец		22

Для осуществления амплификации использовали следующую программу: первичная денатурация при 95°C в течение 5 минут; повтор реакции в течение 49 циклов: 15 секунд при 95°C и 40 секунд при 60°C. Специфичная реакция проходит по каналу флуоресценции ROX, ВПК – HEX.

Для диагностики особо опасных фитоплазм из группы Apple proliferation использовали пару праймеров **f01/r01** (Lorenz et al., 1995) для второго этапа вложенной ПЦР. Праймеры подобраны на участок 16S-23S рРНК гена (PM 7/62 (3), 2020):

f01: 5`-CGGAAACTTTTAGTTTCAGT-3`

r01: 5`-AAGTGCCCAACTAAATGAT-3`.

Первый этап вложенной ПЦР проводили согласно пункту 2.3.2.1, с праймерами P1/P7. Для проведения ПЦР с праймерами f01/r01 использовали следующий состав рабочей реакционной смеси: реакционная смесь (mix) – 5 мкл;

пара f01/ r01 по 1,5 мкл каждого; деионизированная вода – 14,5 мкл; продукт амплификации после 1 этапа – 2,5 мкл. Общий объем равен: 25 мкл.

Применяли данную программу амплификации с праймерами: 1) 95 °С – 1 мин; 2) с последующими 40 циклами при 95 °С – 20 сек, 50 °С – 20 сек и 72 °С – 1 мин; 3) 72 °С – 1 мин. Продукт амплификации равен около 1100 п.н.

Для осуществления видовой идентификации микроорганизма *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation в работе применяли праймеры **ESFYf/ESFYr** (Yvon et al., 2009):

ESFYf: 5`-CCATCATTTAGTTGGGCACT-3`

ESFYr: 5`-ATAGGCCCAAGCCATTATTG-3`.

Для идентификации фитоплазмы использовали следующий состав реакционной смеси: реакционная смесь (mix) – 5 мкл; пара ESFYf/ ESFYr по 1 мкл каждого; деионизированная вода – 16 мкл; тотальная ДНК – 2. Общий объем смеси: 25 мкл. В работе использовали следующую программу амплификации: 1) 94 °С – 1 мин; 2) 20 циклов: 94 °С – 30 сек, 65 °С – 20 сек и 72 °С – 45 сек; 3) 20 циклов: 94 °С – 30 сек, 62 °С – 20 сек и 72 °С – 45 сек. Продукт амплификации равен около 504 п.н.

Для видовой дифференциации фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* из группы Apple proliferation методом ПЦР-РВ в работе проводили апробацию четырех **коммерческих наборов** отечественного производства:

1) «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ» для выявления ДНК фитоплазмы пролиферации яблони (Каталог № РН-021, ООО «Синтол»). Специфичная реакция по каналу флуоресценции ROX, внутренний положительный контроль (ВПК) по каналу HEX.

2) «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ» для выявления ДНК фитоплазмы истощения груши (Каталог № РН-022, ООО «Синтол»). Специфика по каналу флуоресценции FAM, ВПК по каналу HEX.

3) «Фитоплазма пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*)» (Каталог № R1-A522-23/2, ООО «АгроДиагностика»). Специфичная реакция осуществляется по каналу флуоресценции FAM, ВПК – HEX.

4) «Фитоплазма истощения груши (*Candidatus Phytoplasma pyri*)» (Каталог № R1-A521-23/2, ООО «АгроДиагностика»). По каналу флуоресценции FAM проходит специфичная реакция, по каналу HEX – ВПК.

### 2.3.2.3. Идентификация фитоплазмы из группы Stolbur

Видовую идентификацию фитопатогенного микроорганизма *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur осуществляли с помощью видоспецифичных праймеров **STOL11f2/STOL11r1** (Daire et al., 1997):

STOL11f2: 5`-TATTTTCCTAAAATTGATTGGC-3`

STOL11r1: 5`-TGTTTTTGCACCGTTAAAGC-3`.

Для проведения классического метода ПЦР использовали следующий состав рабочей смеси: реакционная смесь (mix) – 5 мкл; пара STOL11f2/STOL11r1 по 1 мкл каждого; деионизированная вода – 15,5 мкл; тотальная ДНК – 2,5. Общий объем реакционной смеси равен 25 мкл.

Для проведения амплификации использовали данную программу: 1) 92 °C – 1 мин 30 сек; 2) повторно 30 циклов: 92 °C – 40 сек, 55 °C – 40 сек и 72 °C – 1 мин 10 сек; 3) 72 °C – 5 мин. Размер продукта амплификации составляет около 720 п.н.

Помимо использования универсальных и видоспецифичных олигонуклеотидов для выявления фитоплазмы из группы Stolbur, в работе проводили апробацию тест-системы для видовой идентификации микроорганизма. Для своевременной диагностики и идентификации фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* в экспериментах использовали набор реагентов компании ООО «Синтол» «*Candidatus Phytoplasma solani*-PB» для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины (Каталог № PH-020). Специфичная реакция – FAM, ВПК – HEX.

## 2.4. Биоинформатический анализ и статистическая обработка данных

При изучении фитопатогенных микроорганизмов использовали метод секвенирования – определение нуклеотидной последовательности генома микроорганизма или его фрагмента (Зорина, 2019). В данной работе провели расшифровку нуклеотидных последовательностей положительных образцов по Сэнгеру, согласно методическим рекомендациям (№ 116-2018 МР ВНИИКР) по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов (Бондаренко, Белкин, 2018).

После визуализации продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза (в 1,5%-ном агарозном геле), положительные образцы (ампликоны) подвергали очистке на колонках с использованием коммерческого набора GeneJET PCR Purification Kit (Каталог №K0701, Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции к набору. Измерение концентрации очищенных ампликонов проводили с помощью спектрофотометра NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, США) с разными длинами волн (нанометры, н.м). Для очищенного продукта коэффициент соотношения длин волн  $A_{260}/A_{280}$  должен быть больше 1,8, а значение  $A_{260}/A_{235}$  – больше 2,2 (Великов, 2012). Для расшифровки нуклеотидных последовательностей использовали генетические анализаторы AB-3500 (Applied Biosystems, США) и НАНОФОР 05 (Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Россия).

Биоинформатический анализ и обработку полученных данных методом секвенирования осуществляли через программное обеспечение UGENE (Россия), AliView (Швеция) и BioEdit (США). В международной базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)) проводили поиск нуклеотидных последовательностей, исследуемых ДНК-мишеней, и проверку олигонуклеотидов (праймеров и зондов) на отсутствие гибридизации на близкородственных и сопутствующих объектах. В исследованиях по изучению аналитических характеристик олигонуклеотидов проверяли их на наличие или отсутствие вторичных структур (петли/шпильки, димеры), которые могут

образоваться при отжиге олигонуклеотидов друг с другом или на самих себя (Зорина, 2019). Более подробный анализ проводили с олигонуклеотидами, у которых получены неудовлетворительные результаты ПЦР, с помощью онлайн-приложений: Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator ([biotools.nubic.northwestern.edu](http://biotools.nubic.northwestern.edu)), ThermoFisher Multiple Primer Analyzer ([thermofisher.com](http://thermofisher.com)), Promega Biomath Calculators ([worldwide.promega.com](http://worldwide.promega.com)).

Статистическую обработку полученных данных по выделению ДНК и проведению ПЦР проводили с помощью программы Microsoft Excel с использованием показателей среднего значения и стандартной ошибки (Бараз, Пегашкин, 2014).

## Глава III. Результаты и их обсуждение

### 3.1. Распространение фитоплазм на территориях Российской Федерации и зарубежных стран

В результате изучения научной литературы отечественных и зарубежных авторов, сделан выбор особо опасных видов фитоплазм, которые представляют экологическую и экономическую угрозу производствам, связанным с выращиванием растительных культур. Микроорганизмы *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation и *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur распространены во многих зарубежных странах, а также на территории нашей страны. Определение зон возможного распространения фитопатогенов является актуальной задачей данной работы.

В процессе выполнения работы исследован отечественный и импортный плодово-ягодный и другой растительный материал. Для определения зон возможного распространения фитоплазм и проведения их идентификации проанализировано 2939 образцов растительного материала. Проведена диагностика 55,8% отечественного растительного материала.

На территории Российской Федерации отобраны и проанализированы образцы из 10 областей (Белгородская, Брянская, Воронежская, Калужская, Ленинградская, Московская, Новгородская, Тамбовская, Тверская, Тульская), из 3 краев (Краснодарский, Приморский, Хабаровский) и 2 республик (Дагестан, Крым). Количество образцов, отобранных из разных регионов страны, представлено на рисунке 8.



Рисунок 8 – Исследование пораженного растительного материала на наличие фитоплазм из различных регионов Российской Федерации в период с 2018 по 2021 гг.

Из рисунка следует, что большое количество образцов растений для выявления фитоплазм на территории страны отобрано из Московской области (20,4%), из Республики Крым (15,7%) и из Тульской области (11,3%). Наименьшее количество отобрано из Воронежской области (2,6%), из Тамбовской (2,6%) и из Брянской области (2,2%).

Проводили исследования с образцами пораженных растений, полученных из следующих зарубежных стран: Австрия, Бельгия, Германия, Греция, Испания, Италия, Молдова, Нидерланды, Польша, Сербия и Франция. Количество импортного растительного материала отображено на рисунке 9.

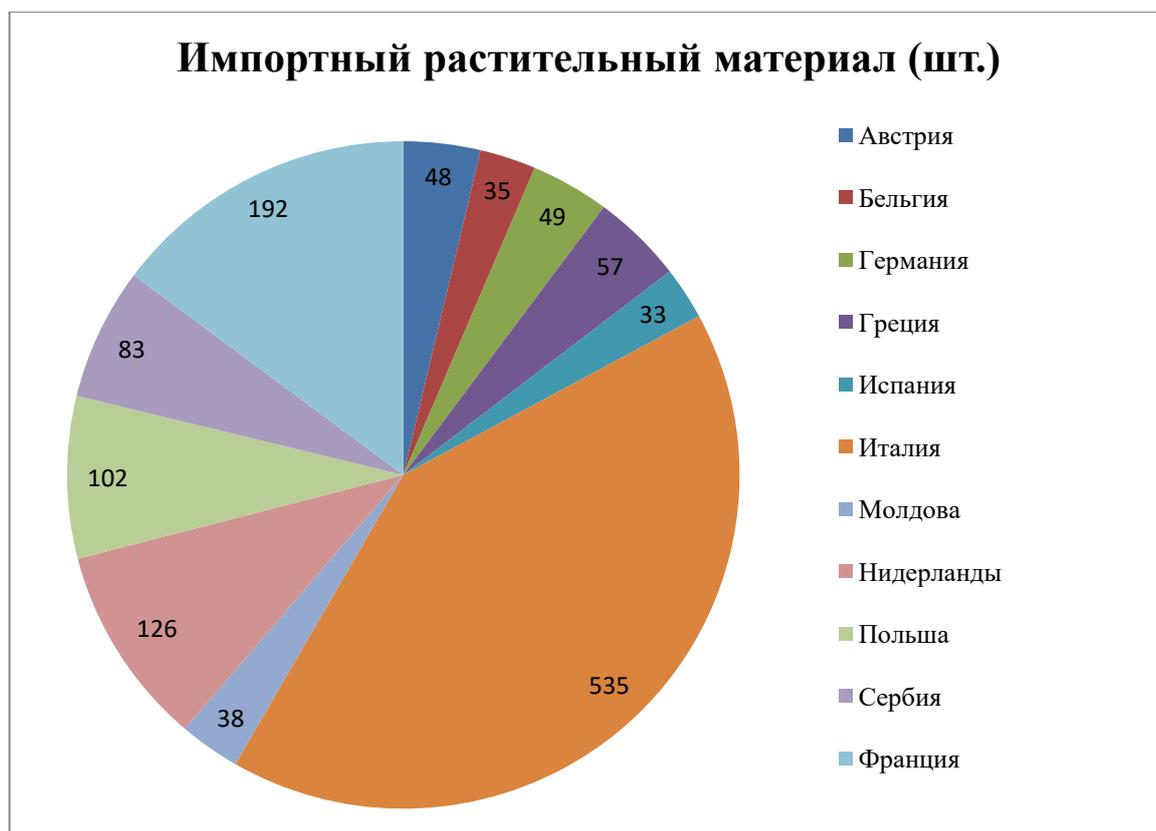


Рисунок 9 – Исследование пораженного растительного материала на наличие фитоплазм из различных регионов зарубежных стран в период с 2018 по 2021 гг.

На рисунке показано, что наибольшее количество импортного биоматериала проанализировано из Италии, что составило 41,2%, из Франции (14,8%) и Нидерландов (9,7%). Наименьшее число растений отобрано из Молдовы (2,9%), Бельгии (2,7%) и Испании (2,5%).

Нами были выбраны основные и возможные растения, которые могут быть резерваторами фитоплазменной инфекции, для исследуемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. Биологический материал для исследования распространения фитоплазм был разнообразным (рис. 10).

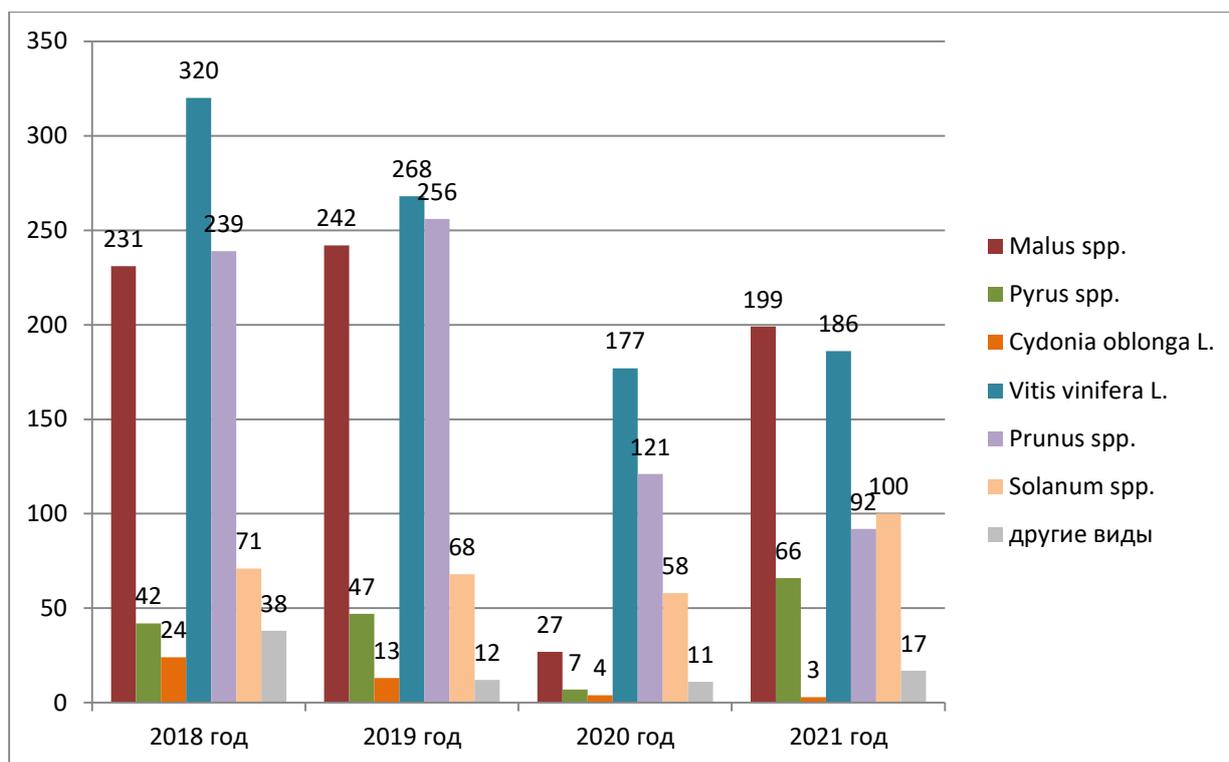


Рисунок 10 – Исследование разнообразного растительного материала на наличие фитоплазм (по оси абсцисс – год отбора образцов, по оси ординат – количество образцов)

На рисунке 12 показано суммарное количество и видовое разнообразие проанализированного растительного материала из различных регионов России и зарубежных стран. Как видно из рисунка 10, отобранные образцы растений различных родов и видов, таких как *Malus* spp. – 699 штук; *Pyrus* spp. – 162; *Cydonia oblonga* L. – 44; *Vitis vinifera* L. – 951; *Prunus* spp. – 708; *Solanum* spp. – 297; другие виды – 78.

Помимо основных растений-хозяев для микроорганизмов, в работе тестировали и другие виды растений с симптомами фитоплазмозов, выступающих в качестве резерваторов фитоплазменной инфекции. В таких растениях патогенные организмы могут находиться в латентной форме, без проявления симптомов заражения микроорганизмами. В таблице 6 представлена информация по проанализированному биоматериалу, отобранному из различных регионов Российской Федерации и зарубежных стран.

Таблица 6 – Видовое разнообразие растений-резерваторов для фитоплазм

№ п/п	Род / Вид	Кол-во	Место	№ п/п	Род / Вид	Кол-во	Место
<b>2018 год</b>							
1	<i>Ulmus</i> spp.	2	Италия	20	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	2	Московская область
2	<i>Fraxinus</i> spp.	7		21	<i>Urtica</i> spp.	2	
3	<i>Rosa</i> spp.	8		22	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	2	Республика Крым
4	<i>Rosa</i> spp.	2	Германия	23	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	2	Тульская область
5	<i>Rubus</i> spp.	5	Италия	24	<i>Barbarea vulgaris</i> W.T.Aiton	3	
6	<i>Lactuca sativa</i> L.	2	Ленинградская область	25	<i>Acer negundo</i> L.	1	
<b>2019 год</b>							
7	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	3	Республика Крым	26	<i>Rhododendron</i> spp.	1	Республика Крым
8	<i>Capparis</i> spp.	1		27	<i>Fritillaria</i> spp.	2	Московская область
9	<i>Clematis</i> spp.	2		28	<i>Achillea millefolium</i> L.	1	
10	<i>Vincetoxicum</i> spp.	1		29	<i>Syringa</i> spp.	1	
<b>2020 год</b>							
11	<i>Rubus</i> spp.	1	Московская область	30	<i>Aegopodium podagraria</i> L.	1	Тульская область
12	<i>Rubus</i> spp.	2	Тульская область	31	<i>Helianthus annuus</i> L.	1	Московская область
13	<i>Juglans regia</i> L.	1		32	<i>Prunus padus</i> L.	1	
14	<i>Trifolium pratense</i> L.	1		33	<i>Petunia</i> spp.	1	
15	<i>Sonchus arvensis</i> L.	1		34	<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planch.	1	
<b>2021 год</b>							
16	<i>Acer negundo</i> L.	1	Белгородская область	35	<i>Bidens</i> spp.	1	Московская область
17	<i>Pinus</i> spp.	1	Республика Крым	36	<i>Taraxacum officinale</i> (L.) Webb ex F.H.Wigg.	1	
18	<i>Tilia</i> spp.	2	Московская область	37	<i>Beta vulgaris</i> L.	8	Воронежская область
19	<i>Syringa</i> spp.	1		38	<i>Centaurea</i> spp.	2	Калужская область

Из таблицы видно, что протестировано 78 образцов растений-резерваторов из разных родов. В 2018 году протестировано 36,8% отечественного материала и 63,2% – импортного материала, в период с 2019 по 2021 гг. анализировали 40 образцов, отобранных с разных регионов Российской Федерации. Больше всего протестировано образцов из *Rosa* spp. (род роза), что составило 12,0%. Проанализировано 10,3% образцов *Beta vulgaris* L. (свекла сахарная) и из *Rubus* spp. (род малина), 9,0% образцов *Convolvulus arvensis* L. (вьюнок полевой) и представителей *Fraxinus* spp. (род ясень). Из Московской области отобрано наибольшее количество пораженного растительного материала, что составило 23,1%, из Белгородской области отобрано наименьшее количество биоматериала – 1,3%.

В ходе исследований отечественного и импортного растительного материала выявлено 46 случаев заражения фитоплазмами некоторых видов растений, что составило 1,6%. Определена видовая принадлежность микроорганизмов. Нами отмечено, что исследуемые виды фитоплазм из группы Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri*) идентифицированы на растениях *Malus* spp. (род яблоня) и *Pyrus* spp. (род груша) из Италии, Молдовы. В 2020 году впервые на территории Российской Федерации выявлены ограниченно распространенные карантинные организмы *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* (Национальный доклад, 2021).

Из группы Stolbur микроорганизм *Candidatus Phytoplasma solani* обнаружен в *Vitis vinifera* L. (виноград культурный) из Республики Крым и в *Beta vulgaris* L. (сахарная свекла) из Воронежской области. Первые сообщения о заражении винограда фитоплазмой *Candidatus Phytoplasma solani* в Республике Крым датируются 2012 годом. В период с 2018 по 2021 года сообщалось о выявлении данного микроорганизма в ампелоценозах Республики Крым (Алейникова, Бондаренко, 2019). В 2019 году, сообщалось о заражении растений сахарной свеклы фитоплазмой *Candidatus Phytoplasma solani solani* (Стогниенко и др., 2020). Данные результаты свидетельствуют о том, что данный фитопатоген

инфицирует растения винограда культурного и сахарной свеклы, что приводит к снижению урожая и гибели растений в целом.

При обследовании растений из Тульской области впервые выявлены фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma convolvuli* (группа 16SrII) и *Candidatus Phytoplasma asteris* (группа 16SrXXXVI) в образцах *Convolvulus arvensis* L. (вьюнок полевой) и в *Barbarea vulgaris* W.T.Aiton (сурепка обыкновенная), соответственно. Информации о выявлении данных микроорганизмов на территории Тульской области ранее не сообщалось.

Растения-хозяева для исследуемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur широко распространены на территории Российской Федерации. Поэтому, считается возможным риск заражения растений особо опасными микроорганизмами естественным путем.

Таким образом, для предотвращения проникновения фитоплазм из зарубежных стран и дальнейшей их акклиматизации на территории нашей страны, необходимо проводить анализ растительного материала на наличие фитопатогенных микроорганизмов с помощью молекулярно-генетических методов не только в растениях-хозяевах, но и в других растениях, выступающих в качестве резерваторов инфекции.

### **3.2. Сравнительное исследование экстракции ДНК фитоплазм различными методами**

Для выявления и идентификации сложных микроорганизмов, таких как фитоплазмы, очень важно использовать апробированные методы выделения ДНК. Качественное выделение ДНК является одним из важных факторов для получения достоверных результатов при проведении молекулярно-генетической диагностики фитопатогенов.

В настоящее время существует большое количество коммерческих наборов реагентов для выделения ДНК микроорганизмов из различных образцов. Поэтому, одной из задач данного исследования было осуществить поиск, апробацию и сравнение оптимальных методов выделения ДНК фитоплазм из

пораженного растительного материала с использованием наборов реагентов отечественного производства.

Для решения данной задачи в опытах использовали инфицированный фитоплазмой *Candidatus Phytoplasma pyri* (группа Apple proliferation) растительный материал *Pyrus communis* L. В опыте осуществляли выделение ДНК микроорганизма *Ca. P. pyri* из биоматериала разными реактивами: по методике Doyle & Doyle, наборами «ЦитоСорб/СytoSorb», «СОРБ-ГМО-Б», «ФитоСорб», «Проба-ГС», «Проба-НК» и «DNeasy Plant Mini Kit». В экспериментах проводили сравнение выделения ДНК микроорганизма наборами реагентов отечественного и зарубежного производства с классической методикой Doyle & Doyle.

Исследовали качество выделения ДНК микроорганизма *Candidatus Phytoplasma pyri* методом ПЦР в реальном времени с помощью набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ» (ООО «Синтол», Россия) на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США). В работе проведена апробация данной тест-системы, результаты представлены в пункте 3.4. Использование метода ПЦР-РВ в диагностике микроорганизмов позволяет быстро и качественно оценить используемые методы экстракции ДНК фитоплазм. В экспериментах определяли значение порогового цикла (Ct) после завершения амплификации. Значение порогового цикла соответствует тому, чем больше находится количество целевой ДНК микроорганизма в образце, тем раньше наблюдается начало порогового цикла.

Выделенную в опытах ДНК фитопатогена из группы Apple proliferation исследовали в 4-х кратной повторности для получения более точного результата. Коммерческий набор позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси специфичный для *Candidatus Phytoplasma pyri* фрагмент гена *aceF* (канал флуоресценции FAM), а также внутренний положительный контроль (ВПК) – канал HEX/R6G.

Результаты проведенных экспериментов по экстракции ДНК фитоплазмы из группы Apple proliferation представлены на рисунках 11 – 24 и в таблице 7.

## Методика Doyle & Doyle

Выделение ДНК микроорганизма из растительного материала по классической методике **Doyle & Doyle** было трудоемким процессом. Рисунки 11 и 12 демонстрируют результаты прохождения ПЦР-РВ с использованием тест-системы для видовой диагностики фитопатогена *Candidatus Phytoplasma pyri* из группы Apple proliferation.

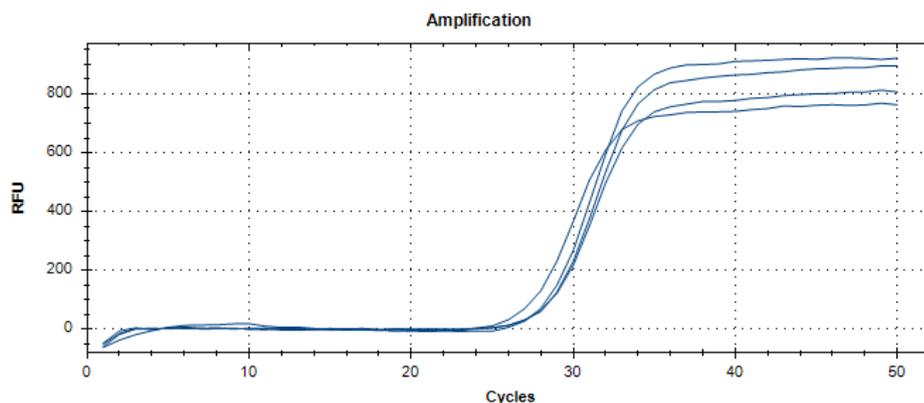
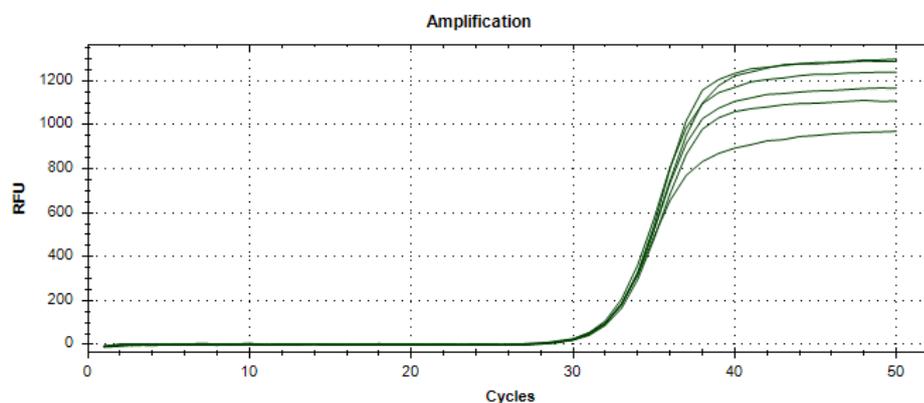


Рисунок 11 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma pyri* по методике Doyle & Doyle, канал флуоресценции FAM, 26,8 Ct (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы\*)

По полученным данным видно, что рекомендованная в протоколе ЕОКЗР (РМ 7/62 (3), 2020) методика экстракции ДНК фитоплазм – Doyle & Doyle, позволила выделить ДНК целевого организма из растительного материала *Pyrus communis* L. (груша обыкновенная). Среднее значение роста уровня сигнала флуоресценции начинается на 26,8 пороговом цикле (Ct).



\* В последующих рисунках 11 – 24: интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы

Рисунок 12 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugii* по методике Doyle & Doyle, канал флуоресценции HEX, 31,2 Ct

Полученные результаты по каналу HEX (ВПК) показывают отсутствие ингибирования реакции и ложноотрицательного результата, что соответствует средние данные порогового цикла равные 31,2 Ct. Преимуществом данного метода является использование ЦТАБ и хлороформа, которые помогают растворять мембраны клеток растений и помогают разделить органическую и водную фазу при экстракции ДНК.

### Наборы реагентов компании ООО «Синтол»

Инфицированный растительный материал *P. communis* L. выделяли тремя разными наборами реагентов отечественной компании ООО «Синтол». Результаты экстракции ДНК целевого микроорганизма *Candidatus Phytoplasma rugii*, с использованием первого коммерческого набора «ЦитоСорб/CytoSorb», представлены на рисунках 13 и 14.

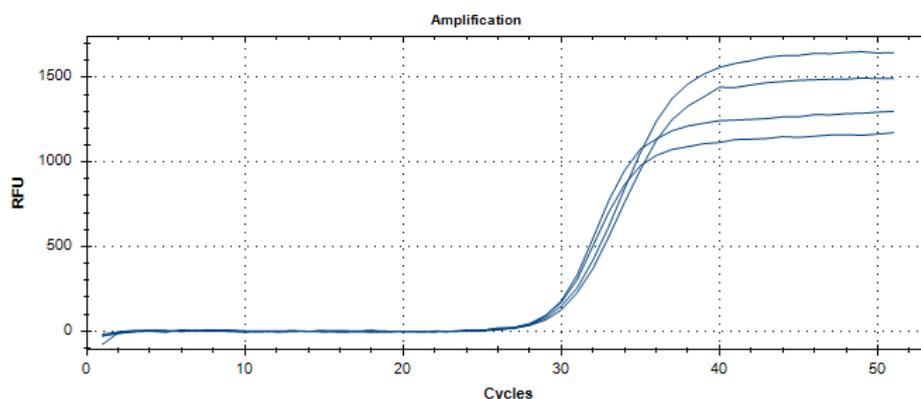


Рисунок 13 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugii* набором реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb», канал флуоресценции FAM, 29,1 Ct

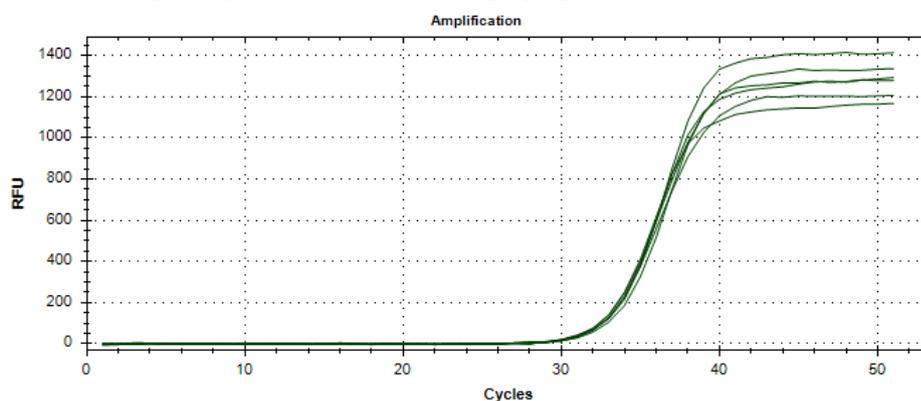


Рисунок 14 – Выделение ДНК *Ca. P. rugii* набором реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb», канал флуоресценции HEX, 32,1 Ct

Из рисунков следует, что тестируемый набор реагентов «ЦитоСорб/СytoSorb» выделяет ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugi* из исследуемого растительного материала, выход кинетической кривой начинается на 29,1 цикле (Ct). По каналу HEX (ВПК) отмечается отсутствие ингибирования реакции и ложноотрицательного результата – 32,1 Ct. Преимуществом данного набора реагентов является использование гидрохлорида гуанидина на этапе лизиса клеток, а также использование в качестве сорбента кремниевых частиц, в присутствии высокой концентрации солей натрия.

Далее в экспериментах использовали второй коммерческий набор под названием «СОРБ-ГМО-Б». Данные по использованию этого набора представлены на рисунках 15 и 16.

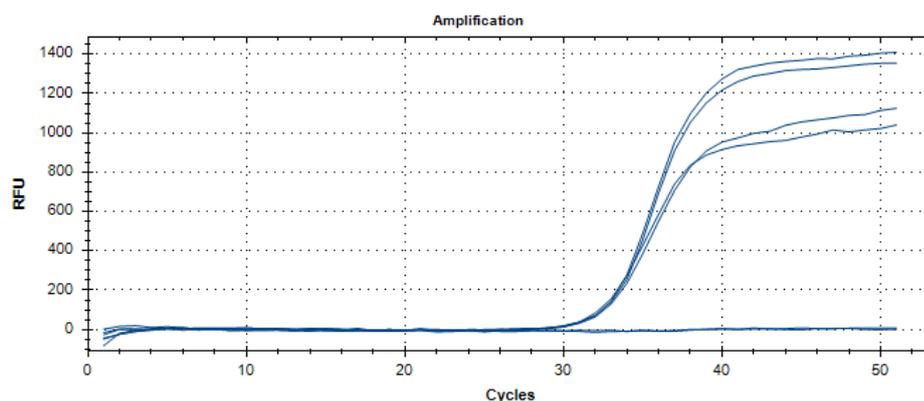


Рисунок 15 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugi* набором реагентов «СОРБ-ГМО-Б», канал флуоресценции FAM, 31,6 Ct

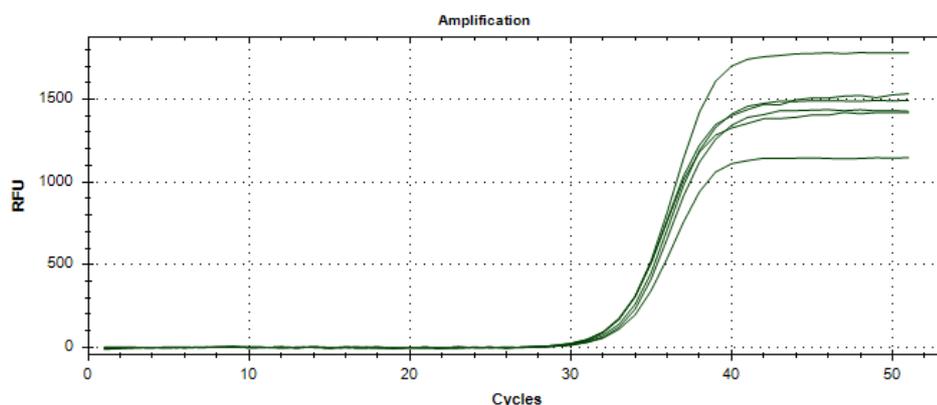


Рисунок 16 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugi* набором реагентов «СОРБ-ГМО-Б», канал флуоресценции HEX, 32,0 Ct

По результатам амплификации, можно сделать вывод, что используемый набор реагентов «СОРБ-ГМО-Б» выделяет ДНК фитопатогена из группы Apple

proliferation, что соответствует рост сигнала флуоресценции на 31,6 цикле (Ct). Также отмечается отсутствие ингибирования и некорректных результатов по каналу HEX (ВПК), среднее значение порогового цикла равно 32,0 Ct.

Результаты использования следующего набора реагентов – «ФитоСорб» показывают способность выделять ДНК микроорганизма *Candidatus Phytoplasma rugii* из растительного материала (рис. 17 и 18).

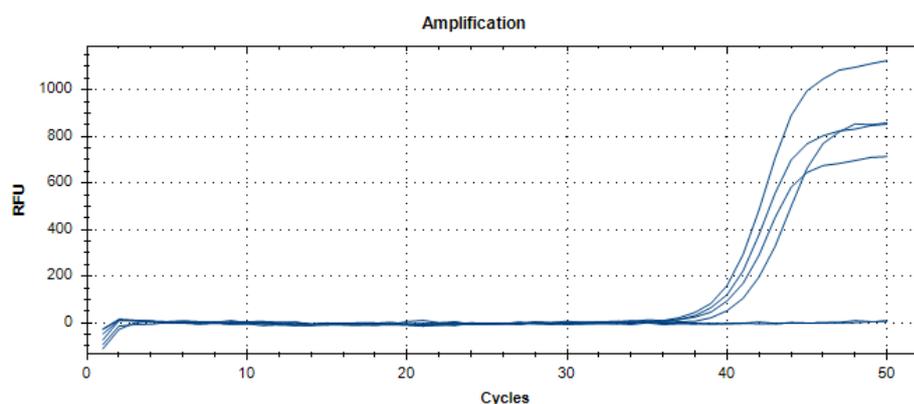


Рисунок 17 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugii* набором реагентов «ФитоСорб», канал флуоресценции FAM, 39,2 Ct

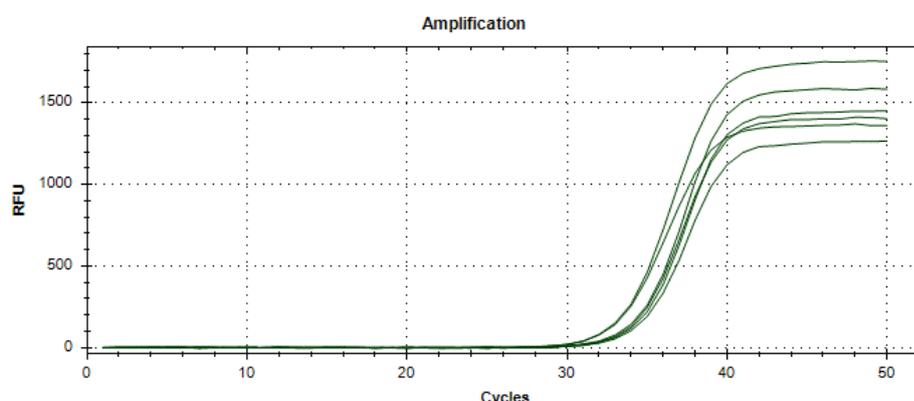


Рисунок 18 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugii* набором реагентов «ФитоСорб», канал флуоресценции HEX, 32,9 Ct

В ходе изучения набора «ФитоСорб», получены данные, которые свидетельствуют о выделении очень малой концентрации целевой ДНК фитопатогена, среднее значение пороговых циклов равно 39,2 Ct. Данные по каналу HEX (ВПК) показывают наличие небольшого ингибирования реакции (32,9 Ct), связанного с наибольшим расхождением сигнала флуоресценции, но с отсутствием ложноотрицательного результата. Ингибирование реакции может

быть связано с недостаточной промывкой магнитного сорбента, входящего в комплект набора, от вторичных метаболитов.

### Комплекты реагентов компании ООО «АгроДиагностика»

В изучении методов экстракции ДНК микроорганизма, использовали и другие комплекты реагентов другой отечественной компании – ООО «АгроДиагностика».

В эксперименте использовали комплект реагентов под названием «Проба-ГС». Результаты тестирования данного комплекта показаны на рисунках 19 и 20.

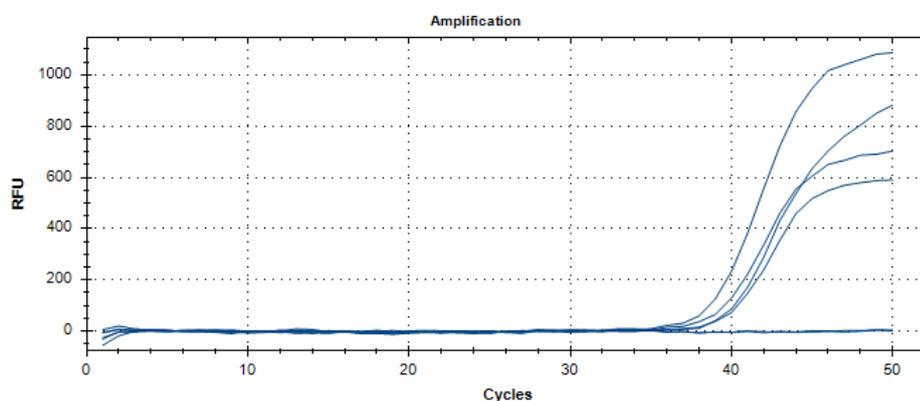


Рисунок 19 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugi* набором реагентов «Проба-ГС», канал флуоресценции FAM, 38,4 Ct

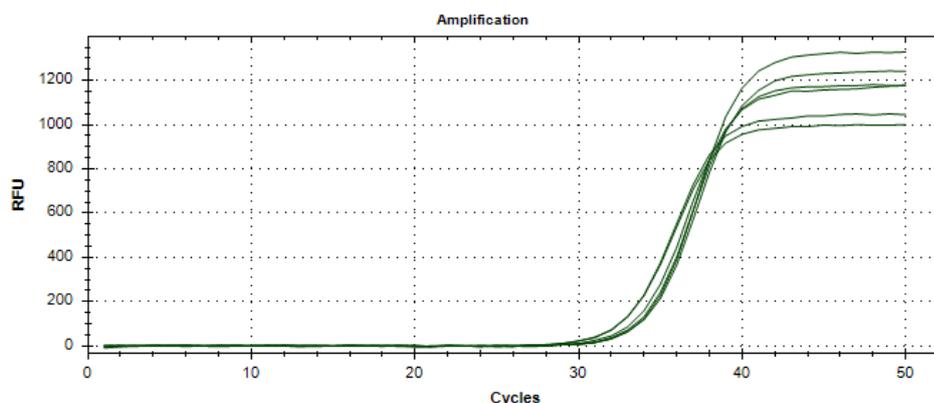


Рисунок 20 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma rugi* набором реагентов «Проба-ГС», канал флуоресценции HEX, 32,5 Ct

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что комплект реагентов «Проба-ГС» выделяет ДНК микроорганизма *Candidatus Phytoplasma rugi*, однако в небольшой концентрации. Об этом свидетельствует выход кинетической кривой, равный 38,4 цикл (Ct). Ингибирование реакции и ложноотрицательного результата показаны на рисунке 20 (32,5 Ct).

Другим коммерческим комплектом отечественной компании послужили реагенты «Проба-НК». Полученные данные по изучению комплекта представлены на рисунках 21 и 22.

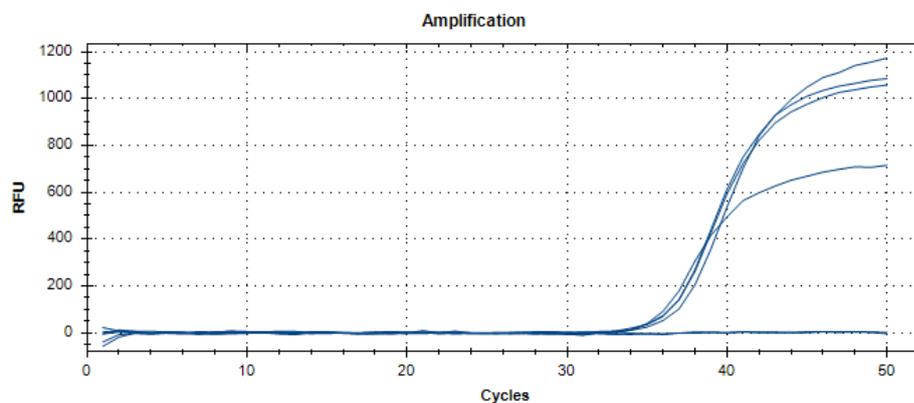


Рисунок 21 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma pyri* комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала «Проба-НК», канал флуоресценции FAM, 35,6 Ct

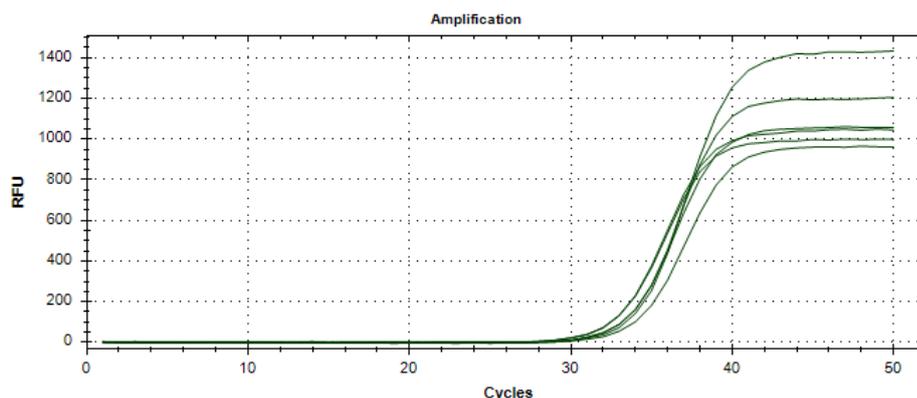


Рисунок 22 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma pyri* комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала «Проба-НК», канал флуоресценции HEX, 32,4 Ct

На рисунках показаны данные по тестированию комплекта «Проба-НК», которые свидетельствуют о выделении ДНК фитоплазмы из группы *Apple proliferation* в небольшой концентрации (35,6 Ct). Ингибирование реакции отсутствует, среднее значение порогового цикла равно 32,4 Ct.

### **Зарубежный набор «DNeasy Plant Mini Kit»**

В исследованиях по методам выделения ДНК фитоплазм, помимо отечественных наборов, использовали известный зарубежный набор «DNeasy Plant Mini Kit», который способен выделить ДНК других фитопатогенов из растительного материала. На рисунках 23 и 24 показаны результаты тестирования

данного набора реагентов в отношении ДНК фитоплазмы из группы *Apple proliferation*.

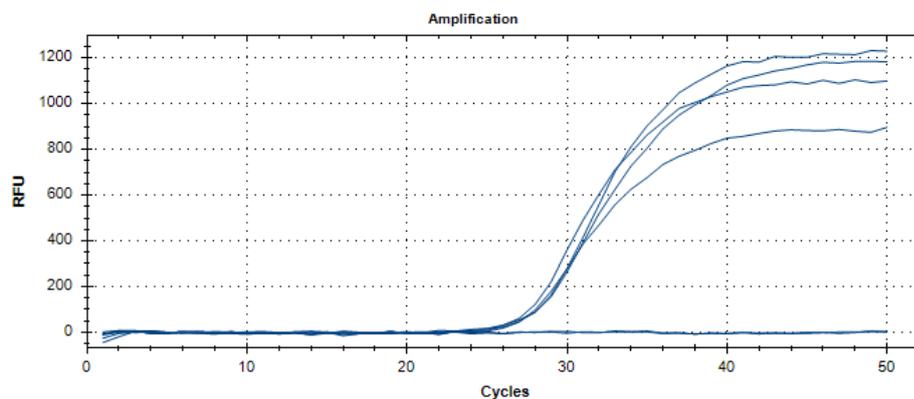


Рисунок 23 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma* *ruyi* набором «DNeasy Plant Mini Kit», канал флуоресценции FAM, 27,4 Ct

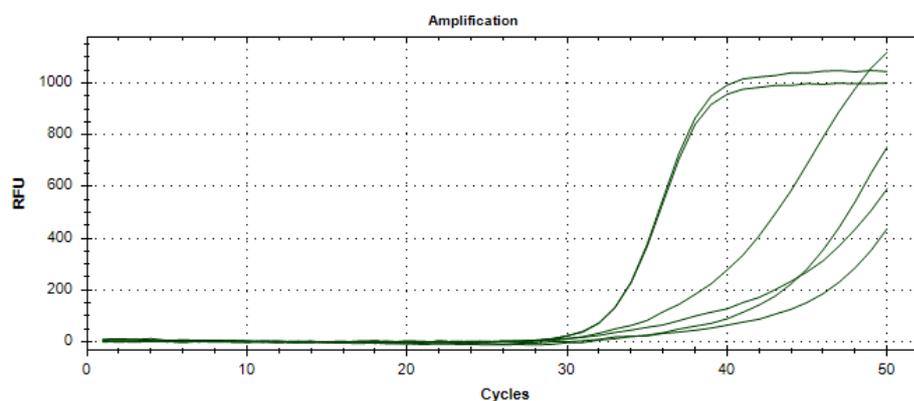


Рисунок 24 – Выделение ДНК *Candidatus Phytoplasma* *ruyi* набором «DNeasy Plant Mini Kit», канал флуоресценции HEX, 40,5 Ct

Полученные данные свидетельствуют, что набор «DNeasy Plant Mini Kit» (США) экстрагирует ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma ruyi* на более ранних пороговых циклах (27,4 Ct). Результаты по каналу HEX (ВПК) показывают наличие сильного ингибирования реакции, чему соответствует среднее значение порогового цикла, равного 40,5 Ct (рис. 24). Ингибирование реакции может быть связано с недостаточной промывкой мембраны спин-колонки, либо с ее малой пропускающей способностью, что не позволило всем вторичным метаболитам перейти в собирательную колонку во время промывок.

Для решения поставленной задачи по сравнительному изучению оптимальных методов выделения ДНК фитоплазм, полученные результаты экспериментов обобщены и представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Выделение ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugii* разными методами

Набор реагентов и пороговый цикл (Ct) по каналу FAM, специфичный для <i>Ca. P. rugii</i> фрагмент гена <i>aceF</i>							
Образец	Методика Doyle & Doyle	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	ЦитоСорб (Синтол)	Сорб-ГМО-Б (Синтол)	Проба-НК (Агро-Диагностика)	Проба-ГС (Агро-Диагностика)	ФитоСорб (Синтол)
<i>Ca. P. rugii</i> (1)	26,9	26,9	28,6	31,9	35,8	38,6	38,7
<i>Ca. P. rugii</i> (2)	27,1	26,9	29,5	31,9	35,9	38,0	39,2
<i>Ca. P. rugii</i> (3)	27,2	27,9	28,5	31,5	35,5	38,6	39,2
<i>Ca. P. rugii</i> (4)	25,9	27,8	29,6	31,0	35,5	38,5	39,8
К-в (1)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
К-в (2)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ср. з. ± Ст. о.	26,8 ± 0,4	27,4 ± 0,3	29,1 ± 0,3	31,6 ± 0,2	35,7 ± 0,1	38,4 ± 0,2	39,2 ± 0,3
Пороговый цикл (Ct) по каналу HEX, внутренний положительный контроль-ВПК							
Образец	Методика Doyle & Doyle	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	ЦитоСорб (Синтол)	Сорб-ГМО-Б (Синтол)	Проба-НК (Агро-Диагностика)	Проба-ГС (Агро-Диагностика)	ФитоСорб (Синтол)
<i>Ca. P. rugii</i> (1)	31,5	49,0	32,1	31,8	32,9	33,1	33,2
<i>Ca. P. rugii</i> (2)	31,1	44,1	32,0	31,6	33,0	33,1	33,1
<i>Ca. P. rugii</i> (3)	31,0	37,7	32,4	32,5	32,6	32,8	33,4
<i>Ca. P. rugii</i> (4)	31,3	49,0	32,5	32,5	32,4	32,6	33,4
К-в (1)	31,4	31,7	31,9	31,9	31,7	31,7	32,5
К-в (2)	30,7	31,7	31,7	31,7	31,7	31,7	32,0
Ср. з. ± Ст. о.	31,2 ± 0,1	40,5 ± 3,6	32,1 ± 0,1	32,0 ± 0,2	32,4 ± 0,3	32,5 ± 0,3	32,9 ± 0,3
Ингибирование	-	+	-	-	-	-	+
<b>Примечание:</b> К-в – отрицательный контрольный образец выделения; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср. з. – среднее значение; Ст. о. – стандартная ошибка.							

Как видно из таблицы 7, самая высокая концентрация ДНК микроорганизма из группы Apple proliferation отмечается при использовании классической методики Doyle & Doyle, что соответствует более раннему пороговому циклу (26,8 Ct) при проведении ПЦР. Зарубежный набор «DNeasy Plant Mini Kit» экстрагирует также высокую концентрацию ДНК микроорганизма, что соответствует среднее значение порогового цикла – 27,4 Ct. Однако, при использовании зарубежного набора, наблюдается ингибирование реакции ПЦР (40,5 Ct), относительно высокая стоимость реагентов, что можно считать недостатком.

При сравнении результатов выделения ДНК фитоплазмы *Ca. P. rugi* с помощью методики Doyle & Doyle и отечественных реагентов, можно сделать вывод, что наборы реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» и «Сорб-ГМО-Б» экстрагируют высокую концентрацию целевой ДНК, среднее значение порогового цикла равно 29,1 Ct и 31,6 Ct, соответственно. Другие отечественные комплекты реагентов экстрагируют значительно меньшее количество ДНК, на несколько порядков (пороговых циклов) меньше: «Проба-НК» – 35,7 Ct; «Проба-ГС» – 38,4 Ct; «ФитоСорб» – 39,2 Ct. При использовании реагентов «ФитоСорб» наблюдается ингибирование реакции ПЦР (32,9 Ct).

Полученные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что все используемые наборы реагентов могут быть использованы для выделения ДНК фитоплазм. Сравнительное тестирование всех наборов реагентов позволяют сделать вывод, что наиболее эффективными отечественными комплектами для экстракции ДНК фитоплазм являются «ЦитоСорб/CytoSorb» и «Сорб-ГМО-Б» компании ООО «Синтол». Данные наборы не уступают по техническим характеристикам по сравнению с классической и трудоемкой методикой Doyle & Doyle. Результаты проведенных исследований легли в основу методических рекомендаций по выявлению и идентификации фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma prunorum*

из группы Apple proliferation (Бондаренко, Башкирова, 2020) (Приложение Д).

### **3.3. Оптимизация идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом полимеразной цепной реакции**

Одной из поставленных задач диагностики фитоплазм было выбрать и оптимизировать молекулярно-генетические методы определения фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation и *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur. Согласно филогенетической классификации выявления фитоплазм использовали олигонуклеотиды, разработанные на участок 16S-23S рРНК гена и межгенный спейсер. Чаще всего, универсальные олигонуклеотиды используют для проведения быстрой диагностики микроорганизмов. С использованием универсальных праймерных систем/тестов (праймеры и зонды) проводится качественный анализ, т.е. наличие или отсутствие фитоплазм в растительном образце.

Для оптимизации метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали 5 реакционных смесей (миксов), для классической ПЦР – 8 миксов отечественных компаний ЗАО «Евроген» и ЗАО «Диалат Лтд» для диагностики исследуемых видов фитопатогенных микроорганизмов. Усовершенствование проведения метода ПЦР для выявления и идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur осуществляли с использованием ДНК целевых микроорганизмов. В работе проведен сравнительный анализ использования 11 реакционных смесей отечественного производства для отработки методов диагностики микроорганизмов.

В таблице 8 представлены результаты проведения ПЦР-РВ на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) с использованием следующих реакционных смесей: 5X qPCRmix-HS, 5X qPCRmix-HS + high ROX, 5X qPCRmix-HS (UDG)

компании ЗАО «Евроген»; 5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025 и 5X Mas<sup>CFE</sup>Taq Mix-2025 компании ЗАО «Диалат Лтд» с тестом UNI2 (Christensen et al., 2013).

Таблица 8 – Исследование фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с использованием миксов для ПЦР-РВ

Образец	Ct, ROX, Среднее значение	Ct, HEX, Среднее значение	Образец	Ct, ROX, Среднее значение	Ct, HEX, Среднее значение
<b>5X qPCRmix-HS</b>			<b>5X qPCRmix-HS + high ROX</b>		
<i>Ca. P. mali</i>	30,73	32,81	<i>Ca. P. mali</i>	31,62	32,72
<i>Ca. P. pyri</i>	31,29	33,26	<i>Ca. P. pyri</i>	39,33	33,03
<i>Ca. P. prunorum</i>	36,20	32,99	<i>Ca. P. prunorum</i>	28,67	32,64
<i>Ca. P. solani</i>	33,58	33,08	<i>Ca. P. solani</i>	14,56	32,70
К-ч	N/A	33,03	К-ч	N/A	32,36
Ср.з. ± Ст.о.	33,0 ± 1,4	33,0 ± 0,1	Ср.з. ± Ст.о.	28,5 ± 6,0	32,7 ± 0,1
<b>5X qPCRmix-HS (UDG)</b>			<b>5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025</b>		
<i>Ca. P. mali</i>	31,07	32,23	<i>Ca. P. mali</i>	31,32	33,17
<i>Ca. P. pyri</i>	32,98	32,05	<i>Ca. P. pyri</i>	32,35	33,22
<i>Ca. P. prunorum</i>	37,90	32,05	<i>Ca. P. prunorum</i>	N/A	33,18
<i>Ca. P. solani</i>	33,01	32,02	<i>Ca. P. solani</i>	N/A	32,99
К-ч	N/A	32,15	К-ч	N/A	33,27
Ср.з. ± Ст.о.	33,7 ± 1,7	32,1 ± 0,04	Ср.з. ± Ст.о.	31,8 ± 0,7	33,2 ± 0,1
<b>Mas<sup>CFE</sup>Taq Mix-2025</b>			<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.		
<i>Ca. P. mali</i>	31,15	34,53			
<i>Ca. P. pyri</i>	32,25	34,39			
<i>Ca. P. prunorum</i>	36,30	37,32			
<i>Ca. P. solani</i>	34,24	34,55			
К-ч	N/A	34,65			
Ср.з. ± Ст.о.	33,5 ± 1,3	35,1 ± 0,6			

Как видно по данным таблицы 8 по исследованию идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Solbur, из 5 проанализированных реакционных смесей отечественного производства, микс 5X qPCRmix-HS считается более оптимальным. Об этом свидетельствует наименьшая величина порогового цикла у исследуемых видов фитоплазм (от 30,73 до 36,20 Ct), уровень сигнала флуоресценции и форма кинетической кривой.

При использовании реакционной смеси 5X qPCRmix-HS + high ROX, у образцов *Candidatus Phytoplasma prunorum* и *Candidatus Phytoplasma solani* относительный уровень сигнала флуоресценции был ниже 100, что связано с

наличием в смеси красителя ROX. Пороговые циклы были 28,67 Ct и 14,56 Ct, соответственно. Ингибирование реакций и ложноотрицательные результаты отсутствовали, согласно данным по каналу флуоресценции HEX.

Микс для ПЦР 5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025 показал ложноотрицательный результат на образцах *Candidatus Phytoplasma prunorum* (группа Apple proliferation) и *Candidatus Phytoplasma solani* (группа Stolbur). Сигналы флуоресценции не были зафиксированы при проведении исследований.

Реакционные смеси 5X qPCRmix-HS (UDG) и Mas<sup>CFE</sup>Taq Mix-2025 показали одинаковые результаты по пороговым циклам и уровню сигнала флуоресценции. Однако, при их сравнении с оптимальным миксом 5X qPCRmix-HS, среднее значение пороговых циклов было ниже (33,7 и 33,5 Ct, соответственно).

На основании полученных данных выбрана реакционная смесь 5X qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген») для постановки ПЦР в реальном времени. Данный микс использовали в дальнейших исследованиях при проведении метода ПЦР в реальном времени. Разница в пороговых циклах и уровне сигнала флуоресценции была обусловлена особенностями реакционных смесей (табл. 2), а именно отличиями в химическом составе, концентрации компонентов и другими факторами.

Следующей задачей нашего исследования по филогенетической идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur проводили оптимизацию классической ПЦР с использованием следующих реакционных смесей: 5X Mas<sup>CFE</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>DD</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>OR</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>XC</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>RGT</sup>Taq Mix-2025 компании ЗАО «Диалат Лтд»; 5X ScreenMix, 5X ScreenMix-HS компании ЗАО «Евроген» с парой праймеров fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995) на приборе Veriti (Applied Biosystems, США). На рисунке 25 отображены результаты постановки ПЦР с использованием положительных образцов

исследуемых фитопатогенных микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur.

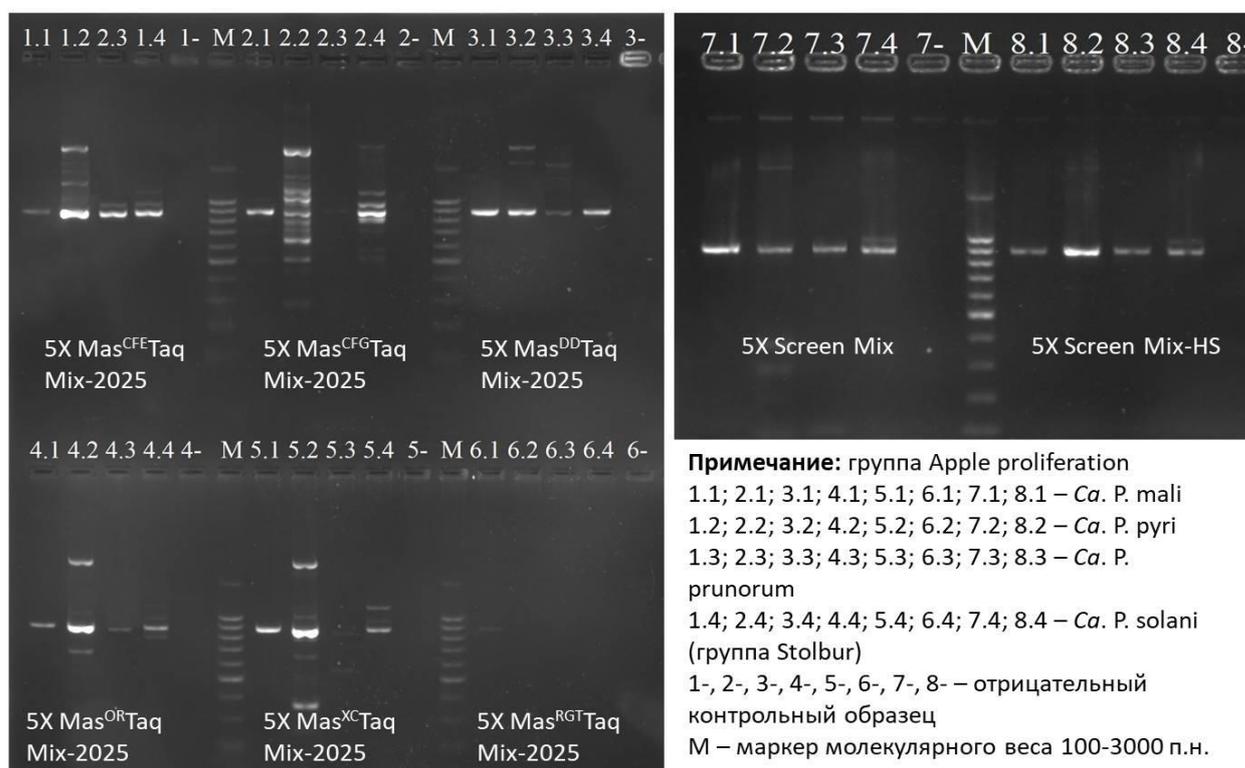


Рисунок 25 – Результаты исследования фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur по оптимизации классической ПЦР с разными реактивами отечественного производства

Полученные результаты показывают, что при использовании миксов 5X Mas<sup>CFE</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>OR</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>XC</sup>Taq Mix-2025, 5X ScreenMix, 5X ScreenMix-HS у образцов 1.2, 2.2, 2.4, 3.2, 3.3, 4.2, 4.4, 5.2, 5.4, 7.1, 7.2, 7.4, 8.2 наблюдается «шмер» – неспецифичное окрашивание по всей длине геля. При прохождении реакции с данными миксами происходит образование неспецифичных побочных продуктов, которые снижают качество целевой ДНК микроорганизма. Исходя из этого, миксы 5X Mas<sup>CFE</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>OR</sup>Taq Mix-2025, 5X Mas<sup>XC</sup>Taq Mix-2025, 5X ScreenMix, 5X ScreenMix-HS не применяли в дальнейших исследованиях.

При использовании микса 5X Mas<sup>RGT</sup>Taq Mix-2025 получен слабо выраженный продукт у образца 6.1. У образцов 6.2 – 6.4 зафиксированы ложноотрицательные результаты, что свидетельствует об отсутствии продукта

амплификации. Исходя из полученных результатов, представленных на рисунке 25, наиболее оптимальным миксом для постановки классической ПЦР считается 5X Mas<sup>DD</sup>Taq Mix-2025. При использовании данной реакционной смеси получены четкие продукты амплификации равные около 950 п.н.

В ходе оптимизации метода ПЦР при сравнении реакционных смесей для диагностики фитоплазм, получены данные, что наилучшим миксом для постановки ПЦР-РВ является 5X qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген»), для постановки классической ПЦР – 5X Mas<sup>DD</sup>Taq Mix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд»). При использовании других реакционных смесей для выявления фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* и *Candidatus Phytoplasma solani* наблюдается образование неспецифичных продуктов реакций, а также ложноотрицательные результаты.

После выбора оптимальной реакционной смеси для постановки ПЦР, проводили определение оптимальной температуры отжига универсальных праймеров fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995) для осуществления стабильной связи с ДНК-матрицей. Оптимизацию программы проведения ПЦР с данной парой праймеров проводили исходя из того, что праймеры, чаще всего, применяют для видовой идентификации микроорганизмов методом секвенирования. Для этого осуществляли классическую амплификацию на приборе Veriti (Applied Biosystems, США) с использованием функции градиента температур от 47 до 57°C (с шагом в 2°C) на этапе отжига праймеров (рис. 26). В исследованиях использовали ДНК особо опасной фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* из группы Apple proliferation.

Из рисунка 26 следует, что при проведении ПЦР с праймерами fU5/rU3 получены продукты амплификации при всех тестируемых температурах. Однако, продукт хорошего качества (более четкий) получен при температуре

57°C. В дальнейших исследованиях с данными праймерами использовали температуру отжига праймеров, равную 57°C.

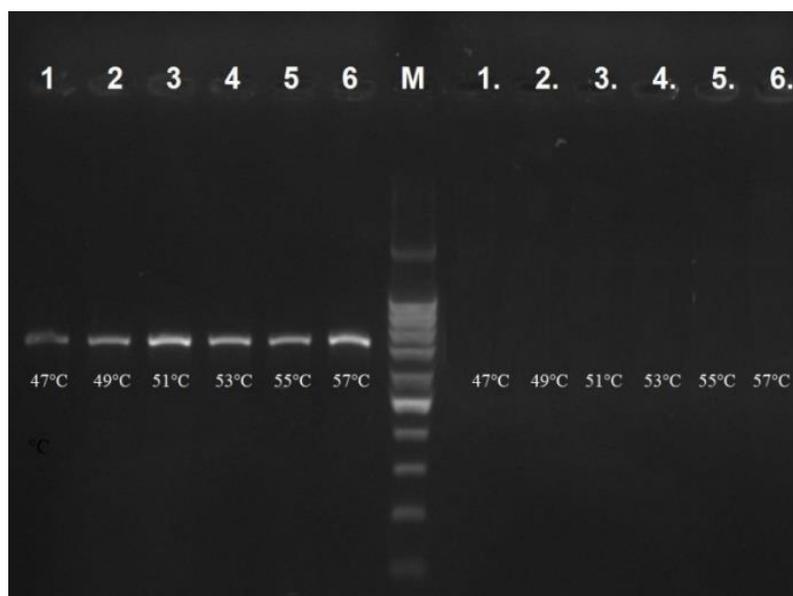


Рисунок 26 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* с праймерами fU5/rU3 с функцией градиента температур: с 1 по 6 – ДНК; с 1. по 6. – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); М – маркер длины продукта ПЦР

Из рисунка следует, что при проведении ПЦР с праймерами fU5/rU3 получены продукты амплификации при всех тестируемых температурах. Однако, продукт хорошего качества (более четкий) получен при температуре 57°C. В дальнейших исследованиях с данными праймерами использовали температуру отжига праймеров, равную 57°C.

Таким образом, впервые подобраны оптимальные реакционные смеси для проведения ПЦР при диагностике фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. На следующих этапах работы исследовали аналитические характеристики универсальных олигонуклеотидов, которые могут быть в диагностике фитоплазм.

### 3.3.1. Использование олигонуклеотидов для выявления фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом ПЦР-РВ

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) является чувствительным методом для диагностики микроорганизмов, что позволяет сократить время

проведения исследований для их идентификации. Изучение аналитических характеристик олигонуклеотидов помогает понять, насколько качественно и точно подобраны олигонуклеотиды, которые играют важную роль для накопления целевого фрагмента исследуемого микроорганизма.

Для изучения фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur проведен метод ПЦР-РВ с использованием универсальных праймеров **UNI2-F/UNI2-R** и зонда **UNI2-probe** (Christensen et al., 2013) на приборе DTprime (ДНК-Технология, Россия). Первым этап изучения аналитических характеристик олигонуклеотидов состоял в проверки их специфичности. Для оценки аналитической специфичности праймеров и зонда использовали ДНК фитопатогенных микроорганизмов и ДНК неинфицированных культур (табл. 1). Результаты изучения специфичности универсального теста UNI2 представлены в таблице 9. Фитоплазмы были представителями нескольких групп: Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*); Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*); Elm yellows (*Candidatus Phytoplasma rubi*); Peanut WB (*Candidatus Phytoplasma convolvuli*).

Как видно из таблицы 9, используемые праймеры UNI2-F/UNI2-R и зонд UNI2-probe позволяют выявить разные виды фитоплазм, что показывают их универсальность. По каналу флуоресценции ROX получены средние значения для исследуемой группы Apple proliferation: для *Candidatus Phytoplasma mali* – 24,0 Ct, *Candidatus Phytoplasma pyri* – 20,6 Ct, *Candidatus Phytoplasma prunorum* – 27,4 Ct. Из исследуемой группы Stolbur получены результаты для вида *Candidatus Phytoplasma solani* – 26,4 Ct. Сравнительное изучение известных представителей из рода *Phytoplasma* spp. позволяет показать специфичность олигонуклеотидов при диагностике фитопатогенов, выступающие как контроли реакции. Поэтому, помимо исследуемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur, олигонуклеотиды детектировали и другие виды фитоплазм, такие как *Candidatus Phytoplasma*

rubi (группа Elm yellows) – 21,4 Ct; *Candidatus Phytoplasma convolvuli* (группа Peanut WB) – 15,8 Ct. Неспецифичные продукты реакции не зафиксированы с использованием ДНК растений-хозяев микроорганизмов (*M. domestica*, *P. communis*, *P. armeniaca*, *V. vinifera*) и с фитопатогенными бактериями (*E. amylovora*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*), что свидетельствует об отсутствии сигнала флуоресценции по каналу ROX (N/A).

Таблица 9 – Использование олигонуклеотидов UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe с использованием ДНК микроорганизмов

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции ROX, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>	24,0	32,9
2	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>	20,6	33,3
3	<i>Candidatus Phytoplasma prunorum</i>	27,4	33,3
4	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	26,4	32,2
5	<i>Candidatus Phytoplasma rubi</i>	21,4	32,7
6	<i>Candidatus Phytoplasma convolvuli</i>	15,8	32,8
7	<i>Malus domestica</i>	N/A	32,4
8	<i>Pyrus communis</i>	N/A	32,9
9	<i>Prunus armeniaca</i>	N/A	32,8
10	<i>Vitis vinifera</i>	N/A	32,8
11	<i>Erwinia amylovora</i>	N/A	33,3
12	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	N/A	33,2
13	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	N/A	32,7
14	К-ч	N/A	32,5
Ср. з. ± Ст. о.		22,6 ± 1,9	32,8 ± 0,1
<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

Следующим этапом исследования аналитических характеристик праймерной системы UNI2 являлось изучение их чувствительности. Изучение аналитическую чувствительность олигонуклеотидов проводили с использованием разведения ДНК исследуемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. В таблице 10 показаны результаты зависимости

уровня флуоресценции канала от номера порогового цикла (Ct) для фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* из группы Apple proliferation.

Для вида *Candidatus Phytoplasma mali* полученные результаты по каналу ROX свидетельствуют о том, что стабильное прохождение реакции осуществляется при разведении образца от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$  (среднее значение 29,9 Ct). Реакция нестабильна при разведении образца в  $10^{-7}$  (среднее значение 38,4 Ct).

Таблица 10 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* для определения аналитической чувствительности теста UNI2

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции ROX, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. mali</i> (исх)	20,4	N/A
2	<i>Ca. P. mali</i> (исх)	20,3	N/A
3	<i>Ca. P. mali</i> (-1)	24,0	N/A
4	<i>Ca. P. mali</i> (-1)	24,0	N/A
5	<i>Ca. P. mali</i> (-2)	27,9	30,1
6	<i>Ca. P. mali</i> (-2)	27,8	30,3
7	<i>Ca. P. mali</i> (-3)	31,0	31,6
8	<i>Ca. P. mali</i> (-3)	30,8	31,3
9	<i>Ca. P. mali</i> (-4)	33,6	32,5
10	<i>Ca. P. mali</i> (-4)	34,6	32,6
11	<i>Ca. P. mali</i> (-5)	36,6	32,9
12	<i>Ca. P. mali</i> (-5)	35,4	32,9
13	<i>Ca. P. mali</i> (-6)	36,4	32,3
14	<i>Ca. P. mali</i> (-6)	36,2	32,9
15	<i>Ca. P. mali</i> (-7)	N/A	33,0
16	<i>Ca. P. mali</i> (-7)	38,4	32,7
17	К-ч	N/A	32,7
Ср. з. ± Ст. о.		30,5 ± 1,6	32,1 ± 0,3

**Примечание:** Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; исх – исходная концентрация образца; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К-ч – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.

Результаты по каналу HEX (ВПК) показывают отсутствие ложноотрицательного результата, однако при внесении исходного образца и при разведении его в 10 раз происходит ингибирование реакции (табл. 10, № п/п 1-4), что может быть связано с наличием ингибиторов в смеси.

Данные изучению чувствительности олигонуклеотидов с использованием ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugi* из группы

Apple proliferation приведены в таблице 11. Результаты по каналу ROX показывают, что реакция проходит при разведении образца до  $10^{-2}$  (среднее значение 30,7 Ct). Нестабильная реакция наблюдается при разведении образца в 1000 раз и более (табл. 11, № п/п 8,9). Отсутствие ложноотрицательного результата свидетельствуют полученные результаты по каналу HEX (ВПК).

Таблица 11 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma pyri* для определения аналитической чувствительности теста UNI2

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции ROX, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. pyri</i> (исх)	28,0	29,7
2	<i>Ca. P. pyri</i> (исх)	28,1	29,6
3	<i>Ca. P. pyri</i> (-1)	30,3	31,2
4	<i>Ca. P. pyri</i> (-1)	30,3	31,2
5	<i>Ca. P. pyri</i> (-2)	33,6	32,6
6	<i>Ca. P. pyri</i> (-2)	33,7	32,5
7	<i>Ca. P. pyri</i> (-3)	N/A	33,2
8	<i>Ca. P. pyri</i> (-3)	36,6	32,9
9	<i>Ca. P. pyri</i> (-4)	38,6	32,9
10	<i>Ca. P. pyri</i> (-4)	N/A	33,0
11	<i>Ca. P. pyri</i> (-5)	N/A	32,9
12	<i>Ca. P. pyri</i> (-5)	N/A	33,1
13	<i>Ca. P. pyri</i> (-6)	N/A	32,9
14	<i>Ca. P. pyri</i> (-6)	N/A	32,9
15	<i>Ca. P. pyri</i> (-7)	N/A	32,7
16	<i>Ca. P. pyri</i> (-7)	N/A	33,0
17	К-ч	N/A	32,8
Ср. з. ± Ст. о.		32,4 ± 1,5	32,3 ± 0,3
<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; исх – исходная концентрация образца; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

Далее, проводили изучение аналитической чувствительности олигонуклеотидов UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe с использованием ДНК *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation (табл. 12).

Полученные результаты в таблице 12 показывают, что при разведении образца в 10000 раз и более происходит нестабильное прохождение реакции с универсальными праймерами UNI2-F/UNI2-R и зондом UNI2-probe. Среднее значение равно 34,0 Ct. Единичные копии фитоплазмы *Candidatus*

*Phytoplasma prunorum* могут быть выявлены при разведении образца  $10^{-4}$  (38,5 Ct),  $10^{-5}$  (37,9 Ct),  $10^{-6}$  (38,2 Ct). При разведении образца в  $10^{-7}$  рост сигнала флуоресценции отсутствовал.

Результаты, полученные по каналу HEX (ВПК), показывают отсутствие ингибирования реакции и ложноотрицательного результата.

Таблица 12 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma prunorum* для определения аналитической чувствительности теста UNI2

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции ROX, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. prunorum</i> (исх)	30,1	35,0
2	<i>Ca. P. prunorum</i> (исх)	30,1	34,2
3	<i>Ca. P. prunorum</i> (-1)	32,6	33,5
4	<i>Ca. P. prunorum</i> (-1)	32,9	33,8
5	<i>Ca. P. prunorum</i> (-2)	36,0	33,7
6	<i>Ca. P. prunorum</i> (-2)	35,2	34,5
7	<i>Ca. P. prunorum</i> (-3)	37,9	32,9
8	<i>Ca. P. prunorum</i> (-3)	37,3	32,8
9	<i>Ca. P. prunorum</i> (-4)	38,5	33,7
10	<i>Ca. P. prunorum</i> (-4)	N/A	32,8
11	<i>Ca. P. prunorum</i> (-5)	37,9	32,6
12	<i>Ca. P. prunorum</i> (-5)	N/A	33,0
13	<i>Ca. P. prunorum</i> (-6)	38,2	33,7
14	<i>Ca. P. prunorum</i> (-6)	N/A	33,8
15	<i>Ca. P. prunorum</i> (-7)	N/A	33,6
16	<i>Ca. P. prunorum</i> (-7)	N/A	33,6
17	К-ч	N/A	35,1
Ср. з. ± Ст. о.		35,2 ± 1,0	33,7 ± 0,2
<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; исх – исходная концентрация образца; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

Графическое представление результатов аналитической чувствительности с использованием ДНК микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri* и *Candidatus Phytoplasma prunorum* представлены в приложении Г.

Изучение чувствительности теста UNI2 с использованием ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur показано в таблице 13. Специфичная реакция зафиксирована при разведении образца до  $10^{-3}$

(среднее значение 36,6 Ct). Единичные копии фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* зафиксированы при разведении образца в  $10^{-6}$  (41,7 Ct).

Таблица 13 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* для определения аналитической чувствительности теста UNI2

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции ROX, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. solani</i> (исх)	33,3	33,7
2	<i>Ca. P. solani</i> (исх)	33,8	33,6
3	<i>Ca. P. solani</i> (-1)	36,3	33,8
4	<i>Ca. P. solani</i> (-1)	35,9	33,0
5	<i>Ca. P. solani</i> (-2)	39,3	33,8
6	<i>Ca. P. solani</i> (-2)	41,1	33,7
7	<i>Ca. P. solani</i> (-3)	N/A	33,9
8	<i>Ca. P. solani</i> (-3)	N/A	32,8
9	<i>Ca. P. solani</i> (-4)	N/A	33,7
10	<i>Ca. P. solani</i> (-4)	N/A	33,5
11	<i>Ca. P. solani</i> (-5)	N/A	32,3
12	<i>Ca. P. solani</i> (-5)	N/A	32,3
13	<i>Ca. P. solani</i> (-6)	41,7	32,2
14	<i>Ca. P. solani</i> (-6)	N/A	32,5
15	<i>Ca. P. solani</i> (-7)	N/A	32,3
16	<i>Ca. P. solani</i> (-7)	N/A	32,4
17	К-ч	N/A	32,4
Ср. з. ± Ст. о.		37,3 ± 1,4	33,4 ± 0,2
<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; исх – исходная концентрация образца; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

По результатам анализа аналитической чувствительности вида *Ca. P. solani* видно, что при разведении образца в 100 раз реакция протекает стабильно (значение от 33,2 до 41,1 Ct). Среднее значение представлено от 30,1 до 37,9 Ct. Единичные копии вида *Candidatus Phytoplasma solani* выявлены при разведении ДНК в  $10^{-6}$  (41,7 Ct), далее специфичная реакция отсутствовала.

На рисунке 27 показаны результаты прохождения реакции с использованием ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur и результаты отсутствия ингибирования реакции ПЦР по каналу HEX (внутренний положительный контроль).

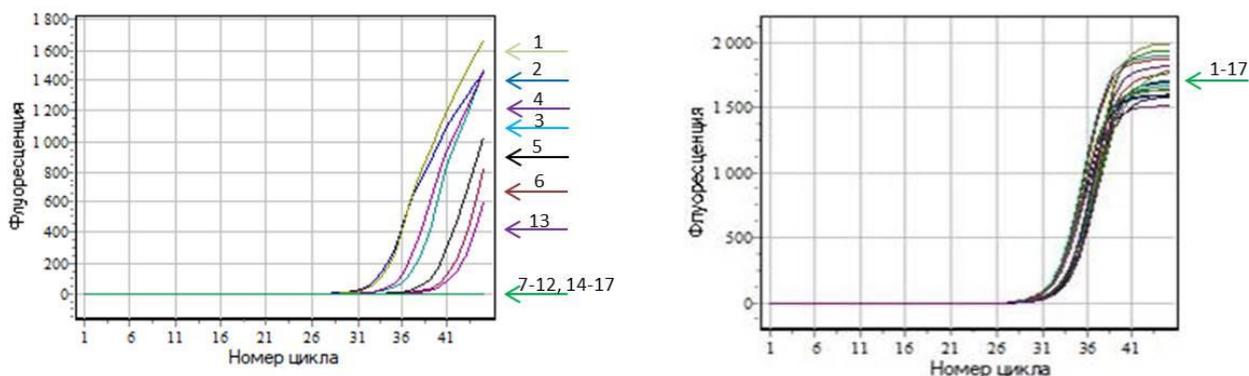


Рисунок 27 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* для изучения аналитической чувствительности теста UNI2 (серия разведений ДНК соответствует № п/п в таблице 13): канал ROX (слева) – микроорганизм, канал HEX (справа) – внутренний положительный контроль

Исходя из полученных результатов по изучению аналитических характеристик олигонуклеотидов UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe, можно сделать вывод, что они обладают достаточно высокой специфичностью и чувствительностью для выявления фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. Данные олигонуклеотиды позволяют выявлять единичные копии исследуемых микроорганизмов, что является актуальным для обнаружения фитоплазм в тканях слабо зараженных растений.

### 3.3.2. Использование праймеров для диагностики фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом вложенной ПЦР

Метод вложенной ПЦР включает в себя два последовательных этапа прохождения реакции с двумя парами праймеров. Данный метод используют для снижения количества неспецифичных и побочных продуктов амплификации. Для того чтобы исключить образование недостоверных результатов, было решено проверить аналитические характеристики олигонуклеотидов, используемых в экспериментах для выявления и идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur.

На данном этапе работы проведено изучение аналитических характеристик универсальных праймеров fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995), разработанных на часть 16S рРНК. Данные праймеры использовали в

качестве второго этапа вложенной ПЦР, после использования пары праймеров **P1** (Deng and Hiruki, 1991)/**P7** (Schneider et al., 1995) для первого этапа.

В опытах по изучению аналитической специфичности использовали ДНК фитоплазм из различных групп: Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*); Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*); Clover proliferation (*Candidatus Phytoplasma trifolii*); Foxtail palm yellow decline (*Candidatus Phytoplasma asteris*); Peanut WB (*Candidatus Phytoplasma convolvuli*); Elm yellows (*Candidatus Phytoplasma rubi*), а также ДНК неинфицированных растений-хозяев (*Malus domestica*, *Pyrus communis*; *Prunus armeniaca*; *Vitis vinifera*) и ДНК особо опасных бактерий растений (*Erwinia amylovora*; *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*; *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*) для исключения образования недостоверных данных (рис. 28).

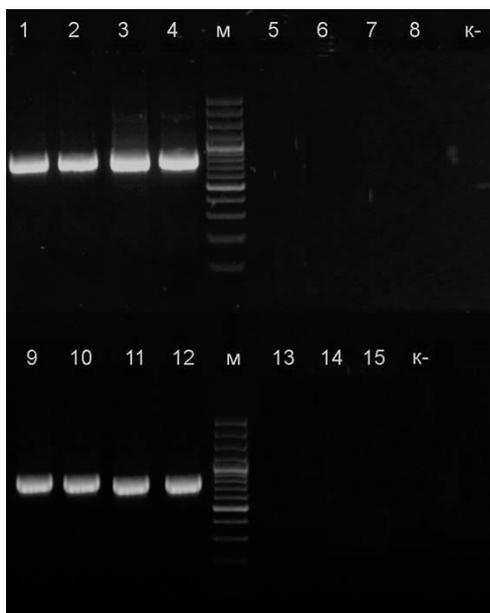


Рисунок 28 – Электрофореграмма диагностики фитоплазм *Candidatus Phytoplasma* spp. и других микроорганизмов методом вложенной ПЦР с праймерами fU5/rU3: 1 – *Ca. P. mali*; 2 – *Ca. P. pyri*; 3 – *Ca. P. prunorum*; 4 – *Ca. P. solani*; 5 – *Malus domestica*; 6 – *Pyrus communis*; 7 – *Prunus armeniaca*; 8 – *Vitis vinifera*; 9 – *Ca. P. trifolii*; 10 – *Ca. P. asteris*; 11 – *Ca. P. convolvuli*; 12 – *Ca. P. rubi*; 13 – *E. amylovora*; 14 – *X. arboricola* pv. *pruni*; 15 – *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*; К- – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); М – маркер длины продукта ПЦР

Результаты исследования показали отсутствие неспецифических продуктов реакции при использовании праймеров fU5/rU3. В ходе проведения амплификации, получен продукт нужной длины размером около 950 п.н. у всех образцов, содержащих ДНК фитоплазм.

Следующим этапом исследований было изучение чувствительности пары праймеров fU5/rU3. В серии опытов по изучению чувствительности праймеров использовали ДНК фитоплазм из группы Apple proliferation и Stolbur. На электрофореграммах получен необходимый продукт амплификации, равный 950 п.н. (рис. 29 и 30).

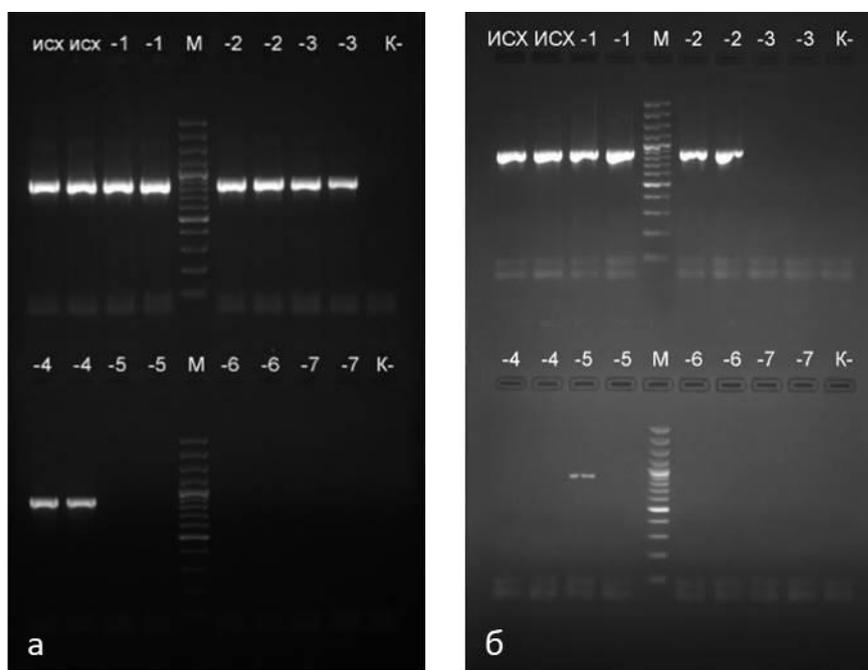


Рисунок 29 – Электрофореграмма вложенной ПЦР с праймерами fU5/rU3: а) *Ca. P. mali*; б) *Ca. P. rugi*; исх – исходная концентрация образца; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/100000000 (-7); К- – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); М – маркер длины продукта ПЦР

Полученные результаты на рисунке 31 показывают прохождение реакции амплификации с ДНК фитоплазм. Об этом свидетельствует наличие белых полос на электрофореграмме, что соответствует необходимому продукту амплификации, равному 950 п.н. Установлено, что реакция с ДНК микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali* стабильна при разведении образца в 10000 раз ( $10^{-4}$ ), далее продукт амплификации не получен (рис.

29а). Прохождение реакции ПЦР с ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugii* зафиксировано при разведении образца в 100 раз ( $10^{-2}$ ), единичные копии микроорганизма отмечены при разведении образца в 100000 раз ( $10^{-5}$ ) (рис. 29б).

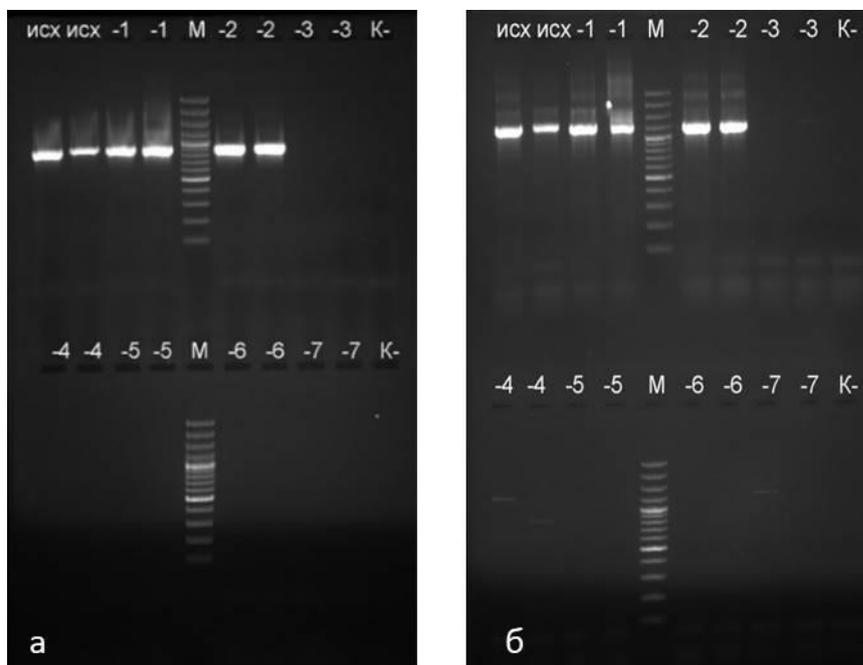


Рисунок 30 – Электрофореграмма вложенной ПЦР с праймерами fU5/rU3: а) *Ca. P. rugorum*; б) *Ca. P. solani*; исх – исходная концентрация образца; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К- – отрицательный контроль ( $H_2O$ ); М – маркер длины продукта ПЦР

По результатам электрофореграммы видно, что прохождение целевой реакции стабильно при разведении образца в 100 раз ( $10^{-2}$ ) для фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugorum* из группы Apple proliferation (рис. 30а) и для микроорганизма *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur (рис. 30б). Полученные продукты амплификации нужной длины свидетельствуют о прохождении реакции с праймерами fU5/rU3. При разведении образцов с ДНК микроорганизмов в 1000 раз наблюдается отсутствие продуктов амплификации, т.е. фитопатоген не был выявлен.

Таким образом, получены продукты нужной длины размером 950 п.н. Отсутствие белой линии на электрофореграмме (рис. 28) у образцов с ДНК растений-хозяев и с ДНК фитопатогенных бактерий говорит о высокой специфичности праймеров fU5/rU3. Выявление ДНК фитоплазм при их

низкой концентрации в растении, говорит о высокой чувствительности праймеров. Разработанные на часть 16S рРНК гена праймеры fU5/rU3 способны выявить целевые организмы из групп Apple proliferation и Stolbur, что свидетельствует о возможности их использования при проведении исследований на наличие фитопатогенных микроорганизмов в растительном материале.

### **3.4. Видовая идентификация фитоплазм из группы Apple proliferation**

Использование универсальных праймерных систем не позволяет быстро идентифицировать микроорганизм до вида. Необходимо проводить видовой анализ фитопатогенов с помощью метода секвенирования, что увеличивает время проведения анализа. В связи с этим, возникла необходимость использования видоспецифичных олигонуклеотидов для расширения возможности точной идентификации микроорганизмов за короткий период времени.

В работе проводили исследование видовой диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) с помощью специфичных олигонуклеотидов, разработанных на участок 16S-23S рРНК гена.

На рисунке 31 представлены результаты изучения специфичности **праймеров F/R** (Nikolic et al., 2010; Mehle et al., 2013b) для группы Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*). Использовали готовую реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green (ООО «Синтол», Россия). Амплификацию осуществляли на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США). Исследование проводили с ДНК разных видов фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (группа Apple proliferation), *Candidatus Phytoplasma solani* (группа Stolbur), *Candidatus Phytoplasma rubi* (Elm yellows), *Candidatus Phytoplasma asteris* (группа Foxtail palm yellow decline).

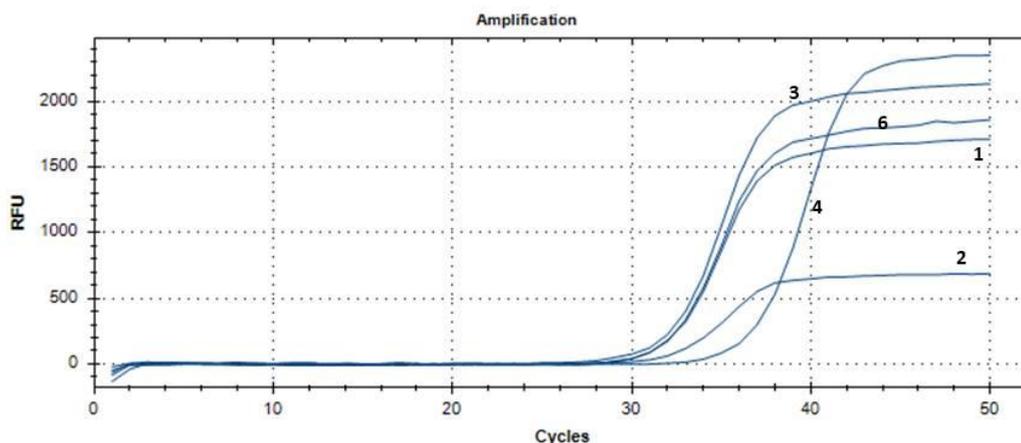


Рисунок 31 – Аналитическая специфичность пары праймеров F/R, канал флуоресценции FAM: 1 – *Ca. P. prunorum*; 2 – *Ca. P. mali*; 3 – *Ca. P. pyri*; 4 – *Ca. P. solani*; 5 – *Ca. P. rubi*; 6 – *Ca. P. asteris* (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы)

Получены неудовлетворительные результаты по изучению специфичности праймеров F/R. На рисунке 31 отмечено, что помимо фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali* (31,3 Ct), *Candidatus Phytoplasma pyri* (33,2 Ct), *Candidatus Phytoplasma prunorum* (31,2 Ct) из группы Apple proliferation, праймеры F/R имеют неспецифичную посадку на другие виды фитоплазм из других групп: *Candidatus Phytoplasma solani* (35,7 Ct) и *Candidatus Phytoplasma asteris* (31,0 Ct). Исходя из полученных данных, в работе не проводили дальнейшие изучения по чувствительности пары праймеров F/R. Ингибирование реакции не наблюдалось по результатам внутреннего положительного контроля, который проходил по каналу флуоресценции HEX (среднее значение равно 31,3 Ct).

Проанализировав данные, можно сделать вывод, что проведение ПЦР-РВ с парой праймеров F/R проводится лишь с рекомендованными видоспецифичными зондами для фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation, что затрудняет применение данного метода из-за дорогостоящих MGB-зондов. В дальнейших исследованиях данные олигонуклеотиды не были использованы.

Для дальнейшего изучения фитоплазм из группы Apple proliferation проводили их диагностику с использованием специфичной пары праймеров **f01/r01** (Lorenz et al., 1995) для данной группы. Для получения достоверных результатов, в эксперименте использовали ДНК фитоплазм следующих видов: *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma trifolii*, *Candidatus Phytoplasma rubi*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli*, *Candidatus Phytoplasma asteris*. В ходе проведения амплификации на приборе SimpliAmp (Applied Biosystems, США), получен нужный продукт, который равен около 1100 п.н. (рис. 32).

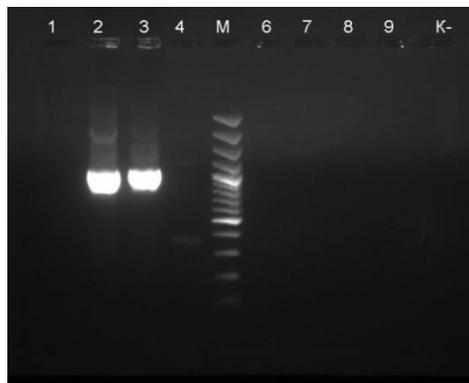


Рисунок 32 – Электрофореграмма вложенной ПЦР с праймерами f01/r01: 1 – *Ca. P. prunorum*; 2 – *Ca. P. mali*; 3 – *Ca. P. pyri*; 4 – *Ca. P. solani*; 6 – *Ca. P. trifolii*; 7 – *Ca. P. rubi*; 8 – *Ca. P. convolvuli*; 9 – *Ca. P. asteris*; К- – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); М – маркер длины продукта ПЦР

Результаты изучения аналитической специфичности пары праймеров f01/r01 для выявления микроорганизмов из группы Apple proliferation, свидетельствуют об отсутствии ложноположительного результата. Однако, на электрофореграмме видно отсутствие целевого фрагмента, размером 1100 п.н., у образца 1, заведомо известного как *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation, что может свидетельствовать о ложноотрицательном результате.

Изучив и проанализировав полученные результаты, решено было провести биоинформатическую проверку специфичных праймеров f01/r01 на отсутствие гибридизации на близкородственных и сопутствующих объектах

с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). В ходе изучения специфичности пары праймеров f01/r01, в выбранной базе данных NCBI, получены результаты, которые свидетельствуют о возможном выявлении фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation. Однако, максимальное количество выявлений изолятов микроорганизмов из группы Apple proliferation с помощью праймеров f01/r01 составило 40 нуклеотидных последовательностей, из них: *Candidatus Phytoplasma mali* – 18 шт., *Candidatus Phytoplasma pyri* – 7; *Candidatus Phytoplasma prunorum* – 11 шт., род *Phytoplasma* spp. – 4 шт. Следует отметить, что при проверке данных праймеров на наличие вторичных структур, получены данные о том, что прямой праймер f01 способен образовывать петлю/шпильку и димерные структуры различной конформации, которые приводят к образованию неспецифичного продукта реакции (рис. 33).

По полученным данным можно сделать заключение, что праймеры f01 и r01 могут быть использованы при проведении ПЦР для идентификации фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri*. Для данных микроорганизмов пара праймеров может применяться как подтверждающий тест при диагностике растений на наличие опасных микроорганизмов из группы Apple proliferation.

Однако применять праймеры f01/r01 для идентификации *Candidatus Phytoplasma prunorum* не рекомендуется ввиду наличия ложноотрицательного результата. Поэтому, дальнейшие исследования с данной парой праймеров не проводились.

**РЕЗУЛЬТАТ.**

Минимальное количество пар оснований, необходимое для димеризации праймера: 5.  
 Минимальное количество пар оснований, необходимое для образования шпильки: 4.

**Возможная структура шпилек:**

5' GGGAAACTTTTAGTTTCAGT 3'

**3' Комплементарность:**

Нет!

**Все возможные сайты, отжигающиеся сами на себя, помечены красным (возможно несовпадение):**

5' GGGAACTTTTAGTTTCAGT 3'  
 3' TGACTTTGATTTCAAAGGG 5'

5' GGGAACTTTAGTTTCAGT 3'  
 3' TGACTTTGATTTCAAAGGG 5'

Рисунок 33 – Результат анализа праймера f01 на наличие петли/шпильки и димеров с использованием онлайн-приложения Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

На следующем этапе исследования осуществляли идентификацию микроорганизма *Candidatus Phytoplasma grunorum* из группы Apple proliferation с помощью видоспецифичных праймеров **ESFYf/ESFYr** (Yvon et al., 2009) на приборе Veriti (Applied Biosystems, США) (рис. 34).

По результатам изучения специфичности праймеров ESFYf/ESFYr, представленных на рисунке 34 видно, что четкий продукт амплификации размером около 504 п.н. получен у образца под номером 4 – *Candidatus Phytoplasma grunorum*. Но следует отметить, что другой изолят микроорганизма *Candidatus Phytoplasma grunorum* из группы Apple proliferation, под номером 3 не был детектирован.

На основе полученных данных, можно сказать, что видоспецифичная пара праймеров ESFYf/ESFYr не селективна в отношении вида *Candidatus Phytoplasma grunorum*, поэтому в работе провели их биоинформатическую проверку с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST.

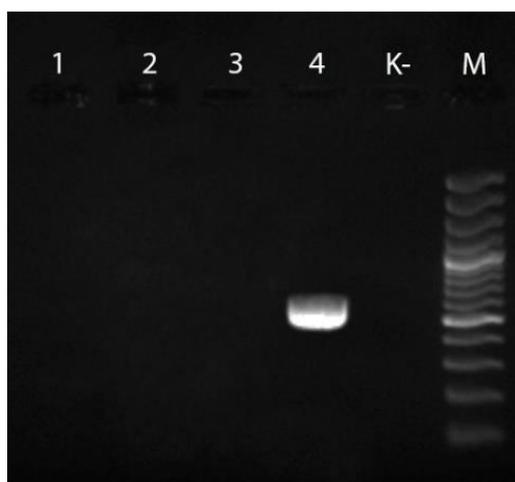


Рисунок 34 – Электрофореграмма классической ПЦР с праймерами ESFYf/ESFYr: 1 – *Ca. P. mali*; 2 – *Ca. P. rugi*; 3 – *Ca. P. prunorum*; 4 – *Ca. P. prunorum*; К- – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); М – маркер длины продукта ПЦР

В ходе проведения работы установили, что праймеры ESFYf/ESFYr позволяют выявить и идентифицировать только 7 нуклеотидных последовательностей ДНК-мишени – фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation, которым присвоены ID в NCBI: 1) >LT746087.1; 2) >LT746086.1; 3) >MG748694.1; 4) >KU578008.1; 5) >JX021444.1; 6) >JQ868450.1; 7) >JF730310.1. Следовательно, праймеры не селективны в отношении вида *Ca. P. prunorum*. Следует отметить, что на рисунке 36 показан полученный продукт амплификации микроорганизма *Candidatus Phytoplasma prunorum*, нуклеотидная последовательность которого нами получена и депонирована в международную базу данных NCBI под шифром >MG748694.

С целью оптимизации проведения ПЦР при изучении фитопатогенных микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma rugi* из группы Apple proliferation, в исследованиях проведена **апробация коммерческих тест-систем** отечественного производства компаний ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика». Данные производители специализируются на наборах реагентов для выявления и видовой идентификации патогенов методом ПЦР в режиме реального времени. В исследованиях использовали заведомо положительные образцы (ДНК)

фитоплазм из группы Apple proliferation, представленных в таблице 1. Все постановки ПЦР-РВ были проведены согласно инструкции по использованию от компаний производителей.

Идентификацию особо опасных фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* с использованием тест-систем «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ» и «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ» компании ООО «Синтол» осуществляли совместно с разработчиками. Для определения аналитической чувствительности тест-систем в работе была использована векторная конструкция на основе плазмиды рAL2-Т (ЗАО «Евроген», Россия) с целевой вставкой фрагмента гена *aceF*, специфичной для фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri*. В эксперименте проведена серия 10-кратных разведений плазмиды рAL2-Т с последующей проверкой тест-систем для идентификации особо опасных фитоплазм из группы Apple proliferation в 2-кратной повторности. Серия разведений плазмиды представляла собой последовательное разбавление исходного образца в 10 раз. Поскольку исходная концентрация плазмиды составляла 47 нанограмм/микролитр (нг/мкл) и рост сигнала флуоресценции начинался с 12 порогового цикла (Ct), поэтому последующие опыты проводили с разведением плазмиды в 1000 раз ( $10^3$ ). Использование данного разведения в эксперименте позволило уменьшить вероятность контаминации рабочего места или реактивов. Исходная концентрация плазмиды составила  $14,0 \times 10^{11}$  копий/мкл.

Аналитическую специфичность тест-систем «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ» и «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ» для идентификации фитоплазм из группы Apple proliferation проверяли на использовании близкородственных и сопутствующих объектах, описанных в пункте 2.1 Материалы исследований. Каждая тест-система специфична по отношению к фитопатогену и выявление *Candidatus Phytoplasma mali* осуществляется на 19,7 пороговом цикле (Ct), а *Candidatus Phytoplasma pyri* – 21,2 Ct.

Результаты аналитической чувствительности тест-системы для идентификации микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali* приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Использование плазмиды рAL2-Т с целевой вставкой фрагмента гена *aceF Candidatus Phytoplasma mali* для определения аналитической чувствительности тест-системы «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ»

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции ROX, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. mali</i> (-3)	19,2	32,2
2	<i>Ca. P. mali</i> (-3)	19,3	32,4
3	<i>Ca. P. mali</i> (-4)	22,7	32,3
4	<i>Ca. P. mali</i> (-4)	22,7	32,3
5	<i>Ca. P. mali</i> (-5)	26,2	32,2
6	<i>Ca. P. mali</i> (-5)	26,1	32,2
7	<i>Ca. P. mali</i> (-6)	29,7	31,8
8	<i>Ca. P. mali</i> (-6)	29,6	31,6
9	<i>Ca. P. mali</i> (-7)	32,9	31,8
10	<i>Ca. P. mali</i> (-7)	33,1	31,8
11	<i>Ca. P. mali</i> (-8)	36,5	31,8
12	<i>Ca. P. mali</i> (-8)	36,5	31,9
13	<i>Ca. P. mali</i> (-9)	N/A	32,2
14	<i>Ca. P. mali</i> (-9)	37,9	32,4
15	<i>Ca. P. mali</i> (-10)	N/A	31,9
16	<i>Ca. P. mali</i> (-10)	N/A	31,7
17	К-ч	N/A	31,9
Ср. з. ± Ст. о.		28,6 ± 1,9	32,0 ± 0,1
<p><b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; ROX – специфика; HEX – ВПК; с -3 по -10 – серия разведений образца плазмиды с целевой вставкой <i>Ca. P. mali</i>; К-ч – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O) без добавления плазмиды; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.</p>			

Полученные результаты по изучению аналитической чувствительности тест-системы компании ООО «Синтол» для идентификации фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* по каналу ROX (специфичная реакция) свидетельствуют о том, что реакция стабильна при разведении ДНК микроорганизма от  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$ . Расчетное значение эффективности ПЦР-РВ составило E=95,1%, наклон кинетической кривой A= -3,44, коэффициент корреляции R<sup>2</sup>=1,000. При разведении образца до  $10^{-9}$  (2 копии/1 реакция) результат был нестабильным (37,9 Ct), при разведении до  $10^{-10}$  наблюдалось отсутствие сигнала флуоресценции. По каналу HEX получены результаты

прохождения внутреннего положительного контроля, которые свидетельствуют об отсутствии ложноотрицательного результата и ингибирования реакции. За положительный результат принимали образцы, показывающие наличие сигнала флуоресценции в каждой повторности.

Исходя из полученных данных, установлена чувствительность ПЦР при использовании набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ», которая составила не более  $14,0 \times 10^3$  копий ДНК в миллилитре пробы.

В дальнейших экспериментах по изучению аналитических характеристик тест-системы для видовой идентификации *Candidatus Phytoplasma rugi* были использованы аналогичные условия, описанные выше.

В ходе эксперимента по изучению аналитической чувствительности тест-системы компании ООО «Синтол» для идентификации фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugi* по каналу FAM (специфичная реакция) получены результаты, которые показывают, что стабильное прохождение реакции отмечено при разведении образца *Candidatus Phytoplasma rugi* от  $10^{-3}$  до  $10^{-9}$  (табл. 15). Расчетное значение эффективности ПЦР-РВ составило  $E=96,6\%$ , наклон кинетической кривой  $A=-3,26$ , коэффициент корреляции  $R^2=0,999$ . При разведении образца от  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$  реакция проходила устойчиво.

При разведении образца до  $10^{-10}$  (2 копии/1 реакция) результат был нестабильным (38,4 Ct). Данные по каналу HEX свидетельствуют об отсутствии ложноотрицательного результата и ингибирования реакции. Чувствительность ПЦР-РВ при использовании набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma rugi*-РВ» не более  $6,0 \times 10^3$  копий ДНК в миллилитре пробы.

Таблица 15 – Использование плазмиды рAL2-Т с целевой вставкой фрагмента гена *aceF Candidatus Phytoplasma pyri* для определения аналитической чувствительности тест-системы «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ»

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции FAM, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. pyri</i> (-3)	17,1	32,5
2	<i>Ca. P. pyri</i> (-3)	17,1	32,4
3	<i>Ca. P. pyri</i> (-4)	20,8	32,3
4	<i>Ca. P. pyri</i> (-4)	20,7	32,5
5	<i>Ca. P. pyri</i> (-5)	24,2	32,7
6	<i>Ca. P. pyri</i> (-5)	24,3	32,5
7	<i>Ca. P. pyri</i> (-6)	27,6	32,6
8	<i>Ca. P. pyri</i> (-6)	27,5	32,6
9	<i>Ca. P. pyri</i> (-7)	31,1	32,3
10	<i>Ca. P. pyri</i> (-7)	31,5	32,7
11	<i>Ca. P. pyri</i> (-8)	34,7	32,6
12	<i>Ca. P. pyri</i> (-8)	34,1	32,6
13	<i>Ca. P. pyri</i> (-9)	37,6	32,5
14	<i>Ca. P. pyri</i> (-9)	38,4	32,7
15	<i>Ca. P. pyri</i> (-10)	N/A	32,9
16	<i>Ca. P. pyri</i> (-10)	38,4	32,7
17	К-ч	N/A	32,5
Ср. з. ± Ст. о.		28,3 ± 2,0	32,6 ± 0,04
<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; FAM – специфика; HEX – ВПК; с -3 по -10 – серия разведений образца плазмиды с целевой вставкой <i>Ca. P. pyri</i> ; К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O) без добавления плазмиды; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

Таким образом, можно сделать вывод, что тест-системы «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ» и «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ» компании ООО «Синтол» являются видоспецифичными, позволяющие с высокой чувствительностью идентифицировать микроорганизмы из группы Apple proliferation. В ходе экспериментов недостоверные результаты отсутствовали.

Следующим шагом в изучении фитоплазм из группы Apple proliferation стало исследование тест-систем «Фитоплазма пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*)» и «Фитоплазма истощения груши (*Candidatus Phytoplasma pyri*)» компании ООО «АгроДиагностика» (Приложение Д). Результаты изучения аналитических характеристик данных тест-систем представлены в таблицах 16-17.

Таблица 16 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* для определения аналитической чувствительности тест-системы «Фитоплазма пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*)»

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции FAM, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. mali</i> (исх)	29,8	28,9
2	<i>Ca. P. mali</i> (исх)	29,9	28,8
3	<i>Ca. P. mali</i> (-1)	33,1	29,6
4	<i>Ca. P. mali</i> (-1)	32,7	29,5
5	<i>Ca. P. mali</i> (-2)	36,8	29,8
6	<i>Ca. P. mali</i> (-2)	36,5	29,7
7	<i>Ca. P. mali</i> (-3)	40,4	29,8
8	<i>Ca. P. mali</i> (-3)	40,1	29,8
9	<i>Ca. P. mali</i> (-4)	N/A	29,7
10	<i>Ca. P. mali</i> (-4)	N/A	29,7
11	<i>Ca. P. mali</i> (-5)	N/A	29,8
12	<i>Ca. P. mali</i> (-5)	N/A	29,9
13	<i>Ca. P. mali</i> (-6)	N/A	29,7
14	<i>Ca. P. mali</i> (-6)	N/A	29,7
15	<i>Ca. P. mali</i> (-7)	N/A	29,7
16	<i>Ca. P. mali</i> (-7)	N/A	29,7
17	К-ч	N/A	29,9
Ср. з. ± Ст. о.		34,9 ± 1,6	29,6 ± 0,1
<p><b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; FAM – специфика; HEX – ВПК; исх – исходная концентрация ДНК; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К-ч – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O) без добавления ДНК; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.</p>			

Идентификация микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali* осуществляется при разведении ДНК до  $10^{-3}$ , что соответствует пороговому циклу (40,4 и 40,1 Ct).

Результаты исследований показали, что с помощью тест-систем «Фитоплазма пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*)» и «Фитоплазма истощения груши (*Candidatus Phytoplasma pyri*)» компании ООО «АгроДиагностика» осуществляется выявление и идентификация микроорганизмов из группы Apple proliferation, при этом перекрестных ложноположительных реакций между близкородственными видами *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* не отмечено.

Таблица 17 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma pyri* для определения аналитической чувствительности тест-системы «Фитоплазма истощения груши (*Candidatus Phytoplasma pyri*)»

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции FAM, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	Ca. P. pyri (исх)	28,0	29,7
2	Ca. P. pyri (исх)	27,9	29,7
3	Ca. P. pyri (-1)	31,8	31,0
4	Ca. P. pyri (-1)	31,6	31,1
5	Ca. P. pyri (-2)	35,2	31,2
6	Ca. P. pyri (-2)	35,7	31,2
7	Ca. P. pyri (-3)	39,7	32,1
8	Ca. P. pyri (-3)	40,1	31,8
9	Ca. P. pyri (-4)	N/A	31,7
10	Ca. P. pyri (-4)	N/A	31,8
11	Ca. P. pyri (-5)	N/A	31,2
12	Ca. P. pyri (-5)	N/A	31,2
13	Ca. P. pyri (-6)	N/A	32,1
14	Ca. P. pyri (-6)	N/A	31,8
15	Ca. P. pyri (-7)	N/A	32,1
16	Ca. P. pyri (-7)	N/A	32,3
17	К-ч	N/A	31,2
Ср. з. ± Ст. о.		33,8 ± 1,8	31,4 ± 0,2
<p><b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; FAM – специфика; HEX – ВПК; исх – исходная концентрация ДНК; с -1 по -7 – серия разведений образца от 1/10 (-1) до 1/10000000 (-7); К-ч – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O) без добавления ДНК; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.</p>			

Результаты тестирования набора реагентов для выявления и идентификации фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma pyri* проводится при разведении ДНК до  $10^{-3}$  (39,7 и 40,1 Ct).

Исследуемые тест-системы отечественного производства ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика» не дали ложноположительных результатов с другими видами фитоплазм, что показывает высокую специфичность комплексов праймеров и зондов для видовой идентификации возбудителей фитоплазмозов из группы Apple proliferation.

Таким образом, для видовой идентификации микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur нами успешно изучены и апробированы возможности использования тест-систем отечественного производства.

### 3.5. Видовая идентификация фитоплазмы из группы Stolbur

Дальнейшим этапом исследования было изучение микроорганизма *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur с помощью специфичной пары праймеров **STOL11f2/STOL11r1** (Daire et al., 1997) и коммерческой тест-системы отечественного производства «*Candidatus Phytoplasma solani*-PB» (ООО «Синтол»), разработанных на участок 16S-23S рРНК гена.

Результаты эксперимента по изучению специфичности праймеров STOL11f2/STOL11r1 представлены на рисунке 35, которые показывают отсутствие продукта амплификации размером около 720 п.н. у образцов под номерами 4 и 5, где содержалось ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani*.

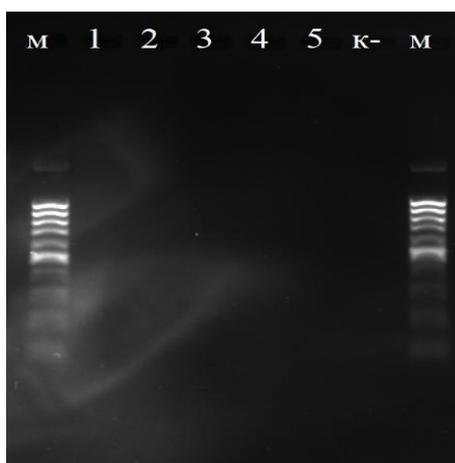


Рисунок 35 – Электрофореграмма классической ПЦР с праймерами STOL11f2/STOL11r1: 1 – *Ca. P. mali*; 2 – *Ca. P. rugi*; 3 – *Ca. P. prunorum*; 4 – *Ca. P. solani*; 5 – *Ca. P. solani*; K- – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); M – маркер длины продукта ПЦР

Далее в работе провели биоинформатический анализ праймеров STOL11f2/STOL11r1 для оценки полученных результатов. Для этого использовали онлайн-сервис NCBI Primer-BLAST ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)) для уточнения возможного количества выявления изучаемого микроорганизма *Ca. P. solani*. В ходе анализа установили, что праймеры STOL11f2/STOL11r1 позволяют идентифицировать только 2 нуклеотидные последовательности фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur, которым присвоены ID в NCBI: 1) >FO393428.1; 2) >FO393427.1. Данную пару

праймеров не рекомендуется использовать в дальнейших исследованиях по идентификации микроорганизма *Candidatus Phytoplasma solani*.

В дальнейших экспериментах изучали аналитические характеристики **тест-системы** компании **ООО «Синтол»** для идентификации микроорганизма *Candidatus Phytoplasma solani*. Для определения аналитической чувствительности набора реагентов была создана векторная конструкция на основе плазмиды pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия) со вставкой нуклеотидной последовательности *Candidatus Phytoplasma solani* размером 119 п.н. (Блинова и др., 2020). Исходная концентрация плазмиды составляла  $2 \times 10^7$  копий/мкл. В результате в качестве мишени для оценки специфичности выявления ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* был выбран ген *seqY*, кодирующий белок, который принимает участие в трансмембранном транспорте. Результаты по изучению аналитических характеристик тест-системы представлены на рисунке 36 и в таблице 18.

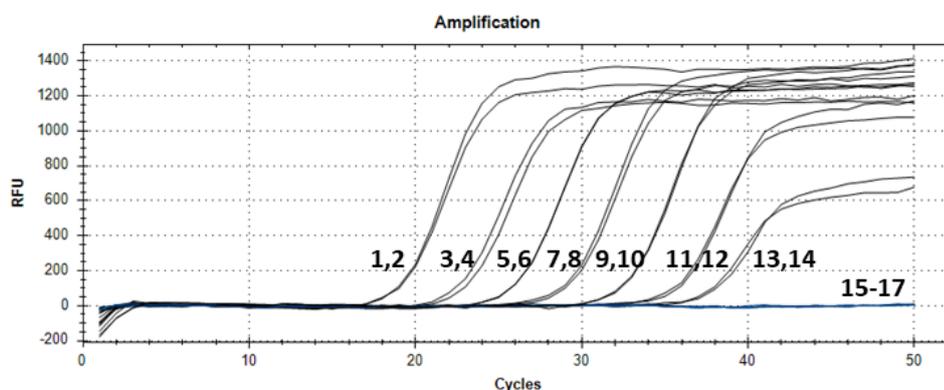


Рисунок 36 – Аналитическая чувствительность набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» (ООО «Синтол») с использованием ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* (серия разведений образца соответствует № п/п в таблице 18): канал FAM – целевой организм (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1:

Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы)

Расчетное значение эффективности ПЦР-РВ для серии из 7 последовательных разведений от  $10^{-3}$  до  $10^{-9}$  раз составило  $E=98,7\%$ , наклон кинетической кривой  $A= -3,36$ , коэффициент корреляции  $R^2=0,999$ . При разведении образца от  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$  реакция проходила стабильно. При разведении образца до  $10^{-10}$  (2 копии/1 реакция) результат варьировал (38,2

St). Ингибирование реакции и недостоверные результаты отсутствуют. Чувствительность ПЦР при использовании набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-PB» не более  $3,0 \times 10^3$  копий ДНК в миллилитре пробы.

Таблица 18 – Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma solani* для определения аналитической чувствительности тест-системы «*Candidatus Phytoplasma solani*-PB»

№ п/п	Образец	Канал флуоресценции FAM, Ct	Канал флуоресценции HEX, Ct
1	<i>Ca. P. solani</i> (-3)	17,9	31,1
2	<i>Ca. P. solani</i> (-3)	17,9	31,5
3	<i>Ca. P. solani</i> (-4)	21,4	31,1
4	<i>Ca. P. solani</i> (-4)	21,8	31,0
5	<i>Ca. P. solani</i> (-5)	24,8	31,2
6	<i>Ca. P. solani</i> (-5)	24,8	31,2
7	<i>Ca. P. solani</i> (-6)	28,4	31,4
8	<i>Ca. P. solani</i> (-6)	28,4	31,2
9	<i>Ca. P. solani</i> (-7)	31,7	31,2
10	<i>Ca. P. solani</i> (-7)	31,6	31,4
11	<i>Ca. P. solani</i> (-8)	34,8	31,3
12	<i>Ca. P. solani</i> (-8)	34,6	31,5
13	<i>Ca. P. solani</i> (-9)	36,3	31,4
14	<i>Ca. P. solani</i> (-9)	36,7	31,5
15	<i>Ca. P. solani</i> (-10)	N/A	31,1
16	<i>Ca. P. solani</i> (-10)	38,2	31,5
17	К-ч	N/A	31,1
Ср. з. ± Ст. о.		28,6 ± 1,8	30,9 ± 0,04
<b>Примечание:</b> Ct – номер цикла; FAM – специфика; HEX – ВПК; с -3 по -10 – серия разведений образца плазмиды с целевой вставкой <i>Ca. P. solani</i> ; К-ч – отрицательный контроль (H <sub>2</sub> O) без добавления плазмиды; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

Таким образом, набор реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-PB» (ООО «Синтол») позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью проводить видовую идентификацию исследуемого микроорганизма из группы Stolbur.

### 3.6. Видовой анализ фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur методом секвенирования

Проводили обследование растительного материала плодово-ягодных и других культур отечественного и зарубежного происхождения. Все образцы

выделенной ДНК проанализировали методом вложенной ПЦР с применением универсальных олигонуклеотидов, разработанных на участок 16S-23S рРНК гена. Для первого этапа вложенной ПЦР использовали универсальную пару праймеров P1 (Deng and Hiruki, 1991)/P7 (Schneider et al., 1995), для проведения второго этапа праймеры fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995), разработанные на участок 16S-23S гена рРНК и межгенный спейсер 16S-23S гена. При проведении горизонтального гель-электрофореза, в работе получили специфичные продукты амплификации размером около 950 п.н.

Проведение филогенетического анализа с помощью метода секвенирования позволило идентифицировать изучаемые виды фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur.

После визуализации результатов амплификации на электрофореграмма, проводили очистку положительных образцов (ампликонов) специальным набором с использованием спин-колонок, связывающего буфера (Binding buffer), промывочного буфера (Wash buffer) и элюирующего буфера (Elution buffer). Очистку ампликонов проводили для удаления остатков праймеров и не связавшихся нуклеотидов.

Следующим шагом было измерение концентрации очищенных продуктов на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, США) для оценки выхода экстрагированной ДНК фитопатогенов. Оптическую плотность растворенного в элюирующем буфере продукта анализировали при трех длинах волн: 235 н.м. для полисахаридов, 260 н.м. для ДНК, 280 н.м. для белков. В таблице 19 представлены данные по измерению концентрации исследуемых положительных образцов.

Таблица 19 – Результаты расшифровки нуклеотидных последовательностей исследуемых микроорганизмов

№ п/п	Шифр	Растение-хозяин	Концентрация ДНК, (нг/мкл)	Результат секвенирования
1	М-1	<i>Malus domestica</i>	23,2	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>
2	М-2	<i>Malus spp.</i>	51,8	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>
3	М-3	<i>Malus spp.</i>	51,5	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>
4	М-4	<i>Malus domestica</i>	55,5	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>

5	P-5	<i>Pyrus communis</i>	29,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri
6	P-6	<i>Pyrus communis</i>	38,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri
7	P-7	<i>Pyrus</i> spp.	11,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri
8	P-8	<i>Pyrus communis</i>	26,9	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri
9	V-09	<i>Vitis vinifera</i>	12,4	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
10	V-10	<i>Vitis vinifera</i>	13,2	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
11	V-11	<i>Vitis vinifera</i>	31,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
12	V-12	<i>Vitis vinifera</i>	20,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
13	V-13	<i>Vitis vinifera</i>	36,1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
14	V-14	<i>Vitis vinifera</i>	32,1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
15	V-15	<i>Vitis vinifera</i>	31,5	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
16	V-16	<i>Vitis vinifera</i>	36,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
17	V-17	<i>Vitis vinifera</i>	34,8	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
18	V-18	<i>Vitis vinifera</i>	30,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
19	V-19	<i>Vitis vinifera</i>	33,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
20	V-20	<i>Vitis vinifera</i>	35,3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
21	V-21	<i>Vitis vinifera</i>	33,1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
22	V-22	<i>Vitis vinifera</i>	27,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
23	V-23	<i>Vitis vinifera</i>	34,2	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
24	V-24	<i>Vitis vinifera</i>	13,2	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
25	V-25	<i>Vitis vinifera</i>	35,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
26	V-26	<i>Vitis vinifera</i>	35,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
27	V-27	<i>Vitis vinifera</i>	39,2	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
28	V-28	<i>Vitis vinifera</i>	13,3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
29	V-29	<i>Vitis vinifera</i>	18,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
30	V-30	<i>Vitis vinifera</i>	33,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
31	V-31	<i>Vitis vinifera</i>	38,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
32	V-32	<i>Vitis vinifera</i>	34,3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
33	V-33	<i>Vitis vinifera</i>	19,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
34	V-34	<i>Vitis vinifera</i>	39,5	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
35	V-35	<i>Vitis vinifera</i>	29,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
36	V-36	<i>Vitis vinifera</i>	26,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
37	V-37	<i>Vitis vinifera</i>	31,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
38	V-38	<i>Vitis vinifera</i>	11,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
39	V-39	<i>Vitis vinifera</i>	19,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
40	V-40	<i>Vitis vinifera</i>	46,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
41	V-41	<i>Vitis vinifera</i>	32,0	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
42	B-42	<i>Beta vulgaris</i>	25,9	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
43	B-43	<i>Beta vulgaris</i>	27,1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
44	B-44	<i>Beta vulgaris</i>	25,7	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani
45	C-45	<i>Convolvulus arvensis</i>	18,5	<i>Candidatus</i> Phytoplasma convolvuli
46	A-46	<i>Barbarea vulgaris</i>	50,6	<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris

Расшифровку полученных нуклеотидных последовательностей проводили на генетических анализаторах зарубежного производства АВ-3500 (Applied Biosystems, США) и отечественного производства НАНОФОР 05 (Институт аналитического приборостроения Российской академии наук).

Методом секвенирования были идентифицированы все 46 образцов фитоплазм, выявленных в ходе исследований. На рисунке 37 представлены результаты секвенирования образца *Pyrus communis* L. (P-5), инфицированного видом *Candidatus Phytoplasma rugi* с использованием программного обеспечения UGENE (Россия). На рисунке 38 показаны результаты множественного выравнивания исследуемых образцов биоматериала *Malus* spp. (M-1, M-2, M-3, M-4), зараженные *Ca. P. mali*, с последовательностями в базе данных NCBI в программе AliView (Швеция).

Из анализа 2939 образцов биоматериала установлено, что 1,6% растений были заражены фитоплазмами. Микроорганизмы *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma rugi* выявлены по 0,1% от исследуемых образцов (одинаковое количество: Италия – 2 шт., Молдова – 2 шт.); в 1,2% фитоплазма *Candidatus Phytoplasma solani* (Воронежская область – 3 шт., Республика Крым – 33 шт.); в 0,1% другие виды фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma convolvuli* и *Candidatus Phytoplasma asteris* (по 1 шт. в Тульской области – 1 шт.).

Данные результаты показывают, что исследуемые особо опасные микроорганизмы распространены в небольшом количестве на территории Российской Федерации и практически не изучены. Следует отметить важность быстрой и точной диагностики фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с использованием молекулярно-генетических методов. Это позволит предсказать многие свойства особо опасных микроорганизмов, разработать меры по распространению и борьбы с ними. На основании проведенных исследований нами сделан вывод, что использование метода секвенирования позволяет провести видовую идентификацию фитоплазм.

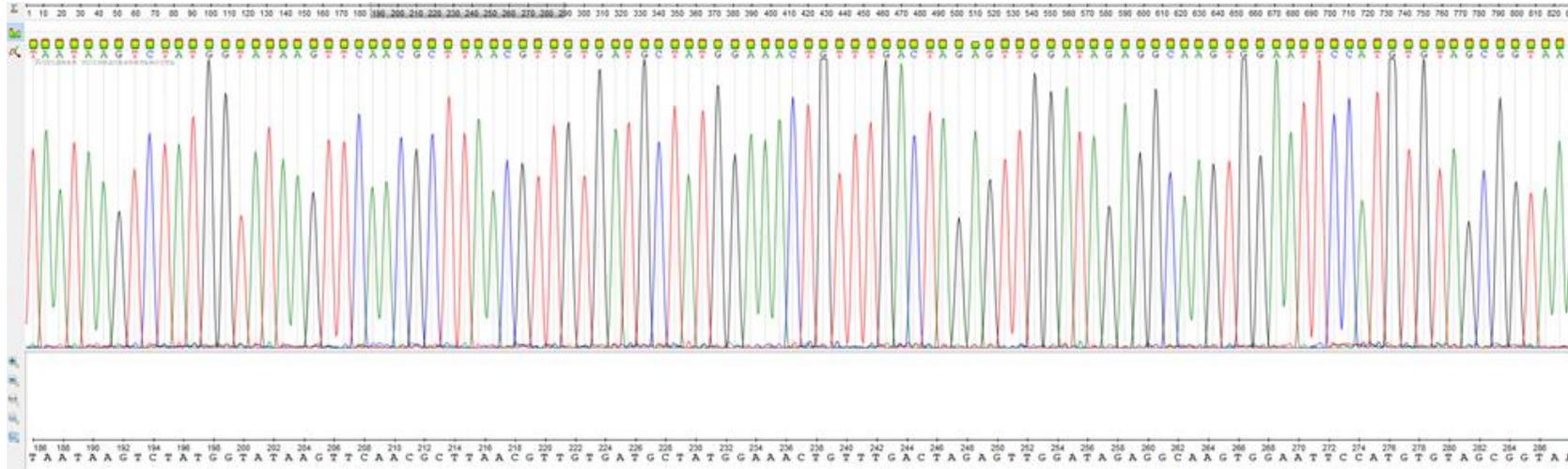


Рисунок 37 – Пример анализа образца *Pyrus communis* L. инфицированный *Candidatus* Phytoplasma pyri (P-5).  
Интерфейс программы UGENE (Россия)

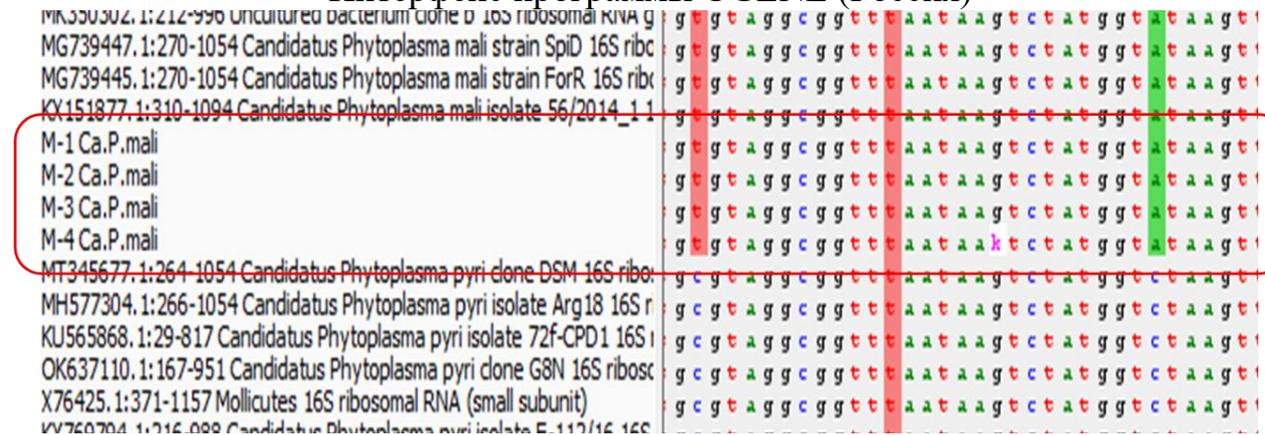


Рисунок 38 – Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей *Candidatus* Phytoplasma mali с нуклеотидными последовательностями в Международной базе данных NCBI на основании изучения фрагмента 16S рРНК гена (розовым и салатным цветом отмечены нуклеотидные замены у разных видов)

Из проведенных исследований видно, что данный участок 16S-23S гена имеет характерные замены, позволяющие проводить видовую идентификацию методом секвенирования по Сэнгеру, с последующим множественным выравниванием на референтные последовательности, либо с использованием онлайн сервиса NCBI BLAST. Наложение пиков в точках замен при анализе образца может свидетельствовать о наличии сразу нескольких штаммов или видов у одного растения-хозяина.

Таким образом, получены оригинальные нуклеотидные последовательности фитоплазм и установлена идентификация видов из группы Apple proliferation и Stolbur.

В работе осуществлена расшифровка и анализ полученных нуклеотидных последовательностей фитоплазм из группы Apple proliferation, представленных в таблице 1. Идентифицированы фитоплазмы *Candidatus phytoplasma mali*, *Candidatus phytoplasma pyri* и *Candidatus phytoplasma prunorum*. Полученные фрагменты генома были собраны с помощью программы BioEdit (США) и составили 1155-1640 п.н. В ходе исследования, последовательности участков 16S-23S рРНК гена фитоплазм из группы Apple proliferation депонированы в международную генетическую базу данных NCBI (табл. 20).

Таблица 20 – Идентификация фитоплазм группы Apple proliferation на основе изучения фрагмента 16S-23S рРНК гена

№ п/п	Вид микроорганизма	Размер продукта (п.н.)	Часть последовательности участка 16S-23S гена	ID в NCBI
1	<i>Ca. P. mali</i>	1155	TCCTGCACSTTAAGTTCAGTTGGCGGACCGGTGAGTTAACACCCTG AAGGTACTTGCTTTAGACGAAGGGATATAGTTGGGAAACCGACTGCT AAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAAACTTTTAAAAAGA CCCCGCAAGGGTATGCTAAAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAG TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGA GAGGGTTGAACGGCCACATTGGGATTGAGATACGGCCAAACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGA CCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAATATTTAGGTATGTAAGTTC TTTTATTAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATCTGACGGTATT TAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATAC ATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTA GGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCTTAACGTTGTGA TGCTATGGAACTGTTTACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAAAT CCATGTGTAGCGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTA GCGAAGGGCGGCTTGGTGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGC GTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA CGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGCTGAAGTTAACACAT TAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGG AATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGA AGATACAGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTA TAGAAATATAGTGGAGGTTACCAGTGATCCAGGTGGTGCATGGTTGT CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACCCCGCAACGAGCGGA	MG74869 3

			ACCCCGATCGCTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGAC TGCCAAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAC	
2	<i>Ca. P. pyri</i>	1498	TGAATACTTTTGTAGTTACAGTGGCGGATCCGGGTGAGTACACGTAAGT AGCTACTTTTCAGACGAGGATATCAGTTAGGAACCGACTGCTAAGACT GGATAGGAAGTTTTTAAGGCATCTTGAAACTTTTTAAAAAGACCCGC AAGGGTATGCTGAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTGGTAA GGTAACGGCTTACCAAGACCATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTG AACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAAAACCTACGCGGAGG CAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAA CGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTAGGTATGTAAGTTCTTTTATTA AAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAA TAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGG GCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCCGTT TAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACGCTTAACGTTGTGATGCTATA GAAACTGTTTACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTG TAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTACGGGAGG CGGCTTGTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAG TACTAAGTGTGGGTAAACCAGTGTGAAAGTTAACGCATTAAGTAC TCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGAC GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTGAGATGATACA CGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAAT ATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAG TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT ATCGCTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGCACTGAA TGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCT TATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGAGTAG CTGAAGCGGAGTTTTTAGCAAATCTCAAAAACAGTCTCAGTTCCGAT TGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC GAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCG CCCGTCAAACCATGAAAGTTGACAATACCCGAAAACAGTAGCCTAA CTTGCAAAAAGAGGGAAGTGTCTAAGGTAGGGTGTGATTTGGGGTTA AGTCGTAAACAAGGTATCCCCCTAAGTGGGGATGGATCCCTCTTT CTAAGGAAAAATATCATCTTTCAGTTGTGAAAAGACCTAAAAAAAT	MG74869 2
3	<i>Ca. P. prunorum</i>	1640	CTCGCGAGAAAAACTTTTTAAGTTCAGTTGCGATCGGTGAGTAATCA CGTAAGTTACCTGCCTCTCAGACGAGGGATACAGTGGGAATCGACTG CTAAGACTGGATATGAAGTTTTGAGGCATCTCGAAACTTTTTAAAAAG ACCCGCAAGGGGTATGCTGAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTA GTTGGTAAGGTAATGGCTTACCCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACT GAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAAAACCTCC TACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTG ACCGAGCAACCGCCGCTGAACGATGAAGTATTTAGGTCAAGTAAAGT TCTTTTATTAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTA TTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAAT ACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGTGC GTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAAGTCAAGTTG TGATGCTATAGAAACTGTTTACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAA ATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCA GTAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAA AGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAGTAAAGTGTGGGTTAAACCAAGTGCAGGTAAGTTAACA CATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAA AGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATT CGAAGATACAGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAAG CTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGGTGGT TGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG CGCAACCCCTATCACTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGA GACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCA TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTA CAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTTTTAGCAAATCTCAAAAAACA GTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAA TCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGG GTTTGTACACACCGCCGTCACAAACCAGAAAAGTTGACAATACCCAAA ACCAGTAGCCTAACTTGCAAAAAGAGGGAAGTGTCTAAGGTAGGGTT GATGATTGGGGTTAAGTCTGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGG GGATGGATCACTCCTTTCTAAGGAAAAATATCATCTTTCAGTTGTGAA AGACTTAAAAAAGTTTTTTATTTTTTAAGATAAAAAATCAATAATGG CTTGGCCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCCCTGATAAGCGTG AGGTCGATGGTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAAAAATATTTATTTA AAAAAA	MG74869 4

В ходе депонирования нуклеотидных последовательностей в базу данных, получены индивидуальные номера (ID), с помощью которых можно найти и

использовать данные в научных исследованиях как на территории Российской Федерации, так и за рубежом. Расшифрованные нуклеотидные последовательности фитоплазм из группы Apple proliferation доступны также в Европейском нуклеотидном архиве ENA ([ebi.ac.uk/ena](http://ebi.ac.uk/ena)) и Японском банке данных DNA Data Bank ([ddbj.nig.ac.jp](http://ddbj.nig.ac.jp)) для использования учеными научных учреждений, а также для разработки методов видовой идентификации и других практических целей.

В исследованиях, на основании идентифицированных по участку 16S рРНК гена нуклеотидных последовательностей фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli* и *Candidatus Phytoplasma asteris*, построено филогенетическое дерево (рис. 39). Построение филогенетического дерева осуществляли в программе UGENE (Россия), используя метод построения PHYLIP Neighbor Joining (метод присоединения соседей), модель для подсчета матрицы (генетических дистанций) F84 – преобразованная модель K80 Кимуры с разнообразной периодичностью встречаемости нуклеотидов.

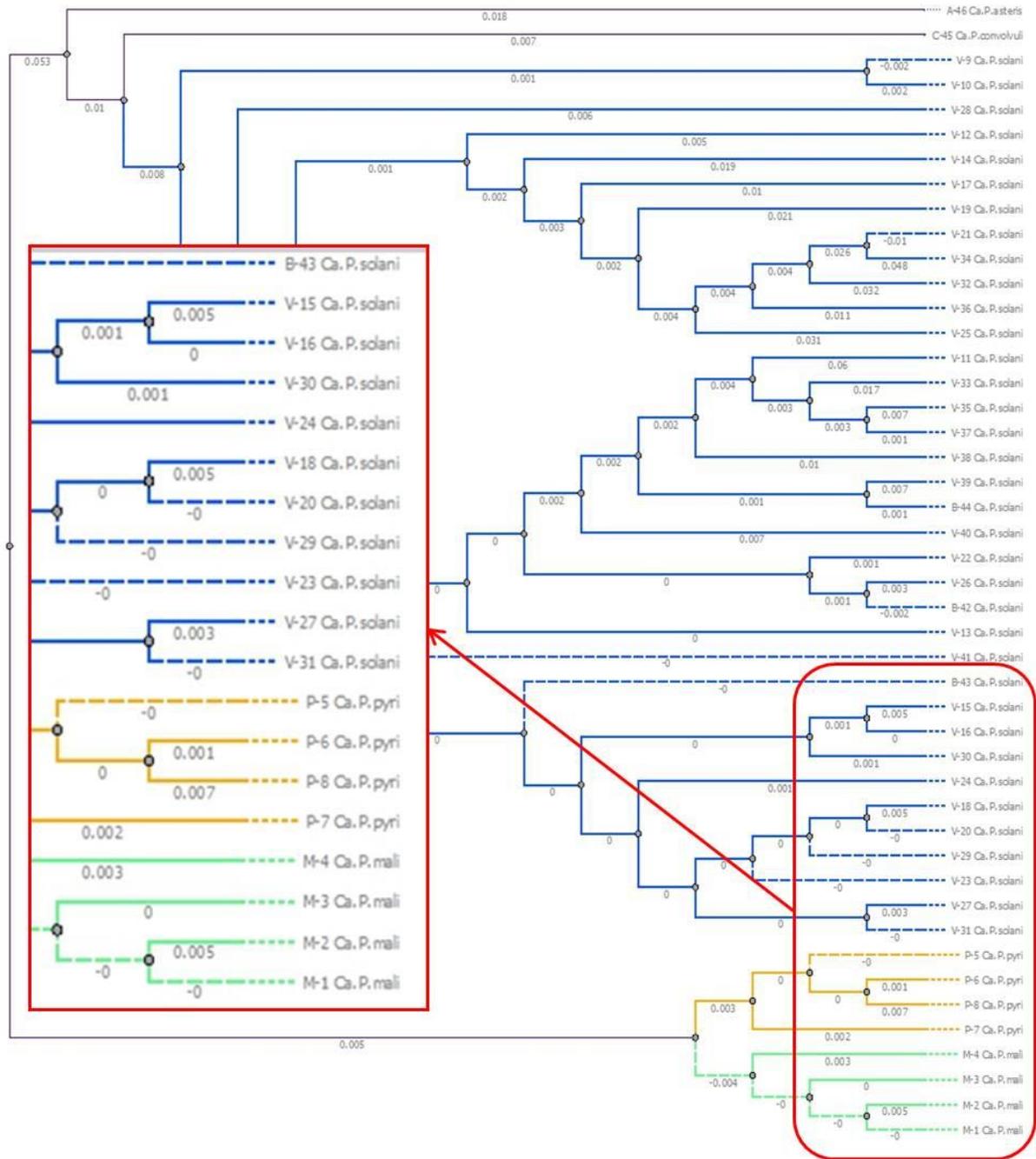


Рисунок 39 – Филогенетическое дерево сходства видов фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli* и *Candidatus Phytoplasma asteris*, идентифицированных в данной работе, по участку 16S рНК гена

Таким образом, проведение филогенетического анализа с помощью метода секвенирования, на основе изучения участков 16S-23S рНК гена, позволило идентифицировать изучаемые виды фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur.

## Заключение

Изучение распространения фитоплазм на территории Российской Федерации, выделение ДНК, разработка методов их идентификации с помощью современных, точных и чувствительных молекулярно-генетических методов расширяет информацию об этих микроорганизмах и дает возможность их классифицировать – все это продолжает оставаться актуальной проблемой не только в области микробиологии, сельского хозяйства, но и для экологии.

Фитоплазмы являются причиной заболеваний нескольких сотен видов растений (фитоплазмозов), которые приводят к значительным экономическим потерям в сельском производстве, а также к развитию эпифитотий (Oshima et al., 2013). Данные возбудители заболеваний растений были выделены в отдельную таксономическую группу «*Candidatus Phytoplasma*» внутри класса Mollicutes (IRPCM, 2004). Симптомы, вызванные заражением растений фитоплазмами, схожи с симптомами заражения другими фитопатогенными микроорганизмами, а также с влиянием экологических факторов. Фитоплазмы имеют малый размер, средний диаметр равен 200-800 нм (Lee et al., 2000).

Особенностью этих микроорганизмов является невозможность культивирования традиционными микробиологическими методами, получения монокультуры и, таким образом, проведения изучения их физиолого-биохимических свойств для определения таксономического статуса (Гирсова и др., 2013). Развитие и совершенствование молекулярных, и генетических методов диагностики позволили определять качественную ДНК и идентифицировать микроорганизмы. Классификация фитоплазм основывалась на развитии технологий, концепций, нововведений в молекулярной биологии. Применение современного и оптимального метода – полимеразной цепной реакции, позволило провести исследования участков генов этих микроорганизмов и выделить их в отдельные группы, на основе изучения гена 16S рРНК. Филогенетический анализ возбудителей фитоплазмозов основан на исследовании участков 16S-23S рРНК

гена, на которые разработаны олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции.

На основании анализа литературных данных, были выбраны микроорганизмы из малоизученных групп Apple proliferation и Stolbur. Изучаемыми видами из первой группы – Apple proliferation, были *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*. Фитоплазмы из групп Apple proliferation и Stolbur являются одними из наиболее опасных и экономически значимых патогенов для плодово-ягодных культур не только для Российской Федерации, но и для других стран. Из второй исследуемой группы Stolbur, изучали фитоплазму *Candidatus Phytoplasma solani*. По классификации на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, группа Apple proliferation обозначается как группа 16SrX, а группа Stolbur – 16SrXII.

Распространение фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur происходит, чаще всего, с помощью зараженного растительного материала и насекомых-переносчиков. При благоприятных условиях для развития, фитопатогенные микроорганизмы *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* и *Candidatus Phytoplasma solani* могут с высокой скоростью распространиться на еще большие территории Российской Федерации и образовать очаги фитоплазменной инфекции.

Одной из центральных задач на начальном этапе работы являлось определение наличия особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur в изучаемом плодовом, ягодном и другом биоматериале, полученного при проведении обследований территорий растительных насаждений на территории Российской Федерации и некоторых зарубежных стран.

В ходе проведения исследований, изучили распространение фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur и их филогенетическую идентификацию, проанализировав отечественный и импортный растительный материал. В работе проанализировано 2939 образцов биоматериала для определения возможных территорий распространения микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali*,

*Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* и *Candidatus Phytoplasma solani*. Биоматериал, отобранный из 15 субъектов Российской Федерации, составил 55,8% от общего количества растений. Самое большое количество отечественного растительного материала для определения наличия опасных микроорганизмов проверено из Московской области, что составило 20,4%. Импортный биоматериал отобран из 11 зарубежных стран, поэтому, наибольшее количество растительных образцов на наличие фитоплазм из групп *Apple proliferation* и *Stolbur* изучено из Италии, что составило 41,2%. Количество растительного материала для изучения распространения фитоплазм варьировало, что составило в 2018 году 965 штук растительных образцов, в 2019 году – 906 шт., в 2020 году – 405 шт., в 2021 году – 663 шт. Исходя из этого, в проведенных исследованиях было выявлено 46 случаев заражения фитоплазмами, что составило 1,6% от общего количества проанализированного биоматериала. Эти сведения касаются не только нескольких областей Российской Федерации, но и некоторых зарубежных стран. Соответственно, следует продолжить исследовать распространение фитоплазм на территории РФ, а также определять зоны риска их распространения и вредоносности.

Следует отметить, что фитоплазмы являются довольно сложными объектами исследования. Распределение микроорганизма в растении осуществляется неравномерно, поэтому важно использовать наиболее оптимальные методы выделения ДНК фитоплазм из растительного материала, для дальнейшего их изучения с помощью молекулярно-генетических методов диагностики. Поэтому, следующей задачей нашего исследования было найти, апробировать и сравнить оптимальные методы экстракции ДНК фитоплазм из пораженного растительного материала с использованием классической методики Doyle & Doyle (PM 7/62(2), 2017) и наборов реагентов отечественного (ООО «Синтол»; ООО «АгроДиагностика») и зарубежного (Qiagen, США) производства. Полученные результаты эксперимента показывают, что наиболее оптимальными и эффективными наборами реагентов для выделения ДНК

фитоплазм из зараженного биоматериала являются наборы «ЦитоСорб/CytoSorb» и «Сорб-ГМО-Б» отечественной компании ООО «Синтол».

На следующем этапе работы была поставлена задача по выбору и оптимизации молекулярно-генетических методов диагностики и идентификации фитопатогенных микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation и *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur. В работе проведено сравнение 11 реакционных смесей отечественного производства для постановки метода ПЦР и усовершенствование метода для выявления и идентификации изучаемых видов фитоплазм. Проведение сравнительного исследования показало, что оптимальной реакционной смесью для постановки ПЦР в реальном времени является смесь 5X qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген»), для классической и вложенной ПЦР – 5X Mas<sup>DD</sup>Taq Mix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд»). После проведения сравнительного анализа реакционных смесей, проводили определение наиболее оптимальной температуры отжига для пары праймеров fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995), которую, в большинстве случаев, используют для видовой идентификации фитоплазм методом секвенирования. Установлено, что продукт амплификации хорошего качества получен при использовании температуры отжига праймеров, равной 57°C.

Для выявления и видовой идентификации фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur важно использовать наиболее чувствительные и точные методы, для получения достоверных результатов. Поэтому, в дальнейших экспериментах изучали аналитические характеристики (специфичность и чувствительность) олигонуклеотидов, разработанных на участки 16S-23S рРНК гена. Полученные результаты по данному опыту свидетельствуют о том, что универсальный тест UNI2 (Christensen et al., 2013) и праймеры fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995) обладают высокой специфичностью – отсутствуют неспецифичные продукты амплификации, и чувствительностью, что позволяет выявить особо опасные микроорганизмы при небольшой концентрации в растительном материале.

Последующим шагом эксперимента было изучение аналитических характеристик праймеров, специфичных для микроорганизмов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation. В ходе использования специфичных праймеров F/R (Nikolic et al., 2010; Mehle et al., 2013) для постановки ПЦР в реальном времени, получены неудовлетворительные результаты, которые показывают неспецифичное выявление фитоплазм из других групп. На основании данных результатов сделан вывод, что использование специфичных праймеров F/R для диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation проводится лишь с рекомендованными, дорогостоящими, видоспецифичными MGB-зондами.

В дальнейших исследованиях использовали другую специфичную пару праймеров – f01/r01 (Lorenz et al., 1995), для проведения второго этапа вложенной ПЦР. На основании данных, полученных в эксперименте по изучению специфичности праймеров установлено, что продукт амплификации нужной длины размером 1100 пар нуклеотидов не получен у одного из исследуемых образцов, заведомо известного как *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation, что может свидетельствовать о ложноотрицательном результате.

На следующем этапе работы проводили изучение видоспецифичных праймеров и коммерческих тест-систем для выявления и идентификации фитопатогенных микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur. Полученные данные экспериментов показывают, что пары праймеров ESFYf/ESFYr (Yvon et al., 2009) и STOL11f2/STOL11r1 (Daire et al., 1997) не позволяют провести видовую идентификацию микроорганизма *Candidatus Phytoplasma prunorum* и *Candidatus Phytoplasma solani*, соответственно.

Использование тест-систем отечественного производства компаний ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика» позволяют провести быструю, точную видовую идентификацию фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma solani* из групп Apple proliferation и Stolbur. Изучение и апробация данных тест-систем показали высокую

специфичность и чувствительность. Следует отметить, что ложноположительные и ложноотрицательные результаты отсутствовали.

По результатам секвенирования нами получены и депонированы нуклеотидные последовательности фитоплазм из группы Apple proliferation в Международную базу данных NCBI ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)), которые также доступны в Европейском нуклеотидном архиве ENA и Японском банке данных ДНК DNA Data Bank для научных целей.

В ходе изучения распространения фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur, нами было выявлено 46 случаев заражения биоматериала фитоплазмами. Определена видовая принадлежность микроорганизмов: *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* идентифицированы на растениях *Malus* spp. и *Pyrus* spp.; *Candidatus Phytoplasma solani* обнаружен на растениях *Vitis vinifera* L. и на растениях *Beta vulgaris* L.; *Candidatus Phytoplasma convolvuli* на биоматериале *Convolvulus arvensis* L. и *Candidatus Phytoplasma asteris* в растении *Barbarea vulgaris* W.T.Aiton. На основе изучения полученных нуклеотидных последовательностей фитоплазм, построено филогенетическое дерево.

## Выводы

1) Проведено исследование по распространению особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur в некоторых регионах Российской Федерации и зарубежных стран. Из проанализированных образцов растительного материала выявлено и идентифицировано 46 случаев заражения изучаемыми фитопатогенными микроорганизмами.

2) Осуществлено сравнительное изучение и апробация методов экстракции ДНК фитоплазм из растительного материала. Отечественные наборы реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb», «Сорб-ГМО-Б» уменьшают время проведения исследования и не уступают по техническим характеристикам по сравнению с классической методикой Doyle & Doyle.

3) Впервые подобраны оптимальные реакционные смеси для проведения ПЦР при диагностике фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur.

4) Для видовой идентификации микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur успешно изучены и апробированы возможности использования тест-систем отечественного производства.

5) Осуществлена видовая идентификация полученных нуклеотидных последовательностей фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на основе изучения участков 16S-23S рРНК гена. Полученные нуклеотидные последовательности микроорганизмов из группы Apple proliferation депонированы в Международную базу данных NCBI.

## Список сокращений

МПО – микоплазмоподобные организмы

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

*Ca. P. – Candidatus Phytoplasma*

п.н. – пара нуклеотидов

AP – Apple proliferation (пролиферация яблони)

PD – Pear decline (истощение груши)

ESFY – European stone fruit yellows (Европейская желтуха косточковых)

BN – Bois noir (почернение коры винограда)

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации

ЕОКЗР – Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений

ЕАЭС – Евразийский экономический союз

РНК – рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

СНГ – Содружество Независимых Государств

PM – Phytosanitary Measures (Фитосанитарные меры)

ИФ – иммунофлуоресцентный анализ

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВПК – внутренний положительный контроль

**Библиографический список использованных  
источников**

1. Алейникова, Н.В. Изучение распространения и развития в ампелоценозах Крыма инвазионного возбудителя фитоплазмоза «почернение древесины винограда» (*Candidatus Phytoplasma solani*) / Н.В. Алейникова, Г.Н. Бондаренко; под. ред. Т.В. Артемьевой. – М.: ВНИИКР, 2019. – 40 с.
2. Ахатов, А.К. Защита овощных культур и картофеля от болезней / А.К. Ахатов, Ф.С. Джалилов, О.О. Белошапкина, Ю.М. Стройков, В.Н. Чижов, А.В. Трусевич; под. ред. А.К. Ахатова и Ф.С. Джалилова. – М., 2006. – 352 с.
3. Балалаева, И.В. Оптическая микроскопия в исследовании структуры и функций биологических объектов / И.В. Балалаева, Е.А. Сергеева, А.Р. Катичев // Часть 1. Широкопольная оптическая микроскопия: Учебно-методическое пособие. – Н. Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 58 с.
4. Бараз, В.Р. Использование MS Excel для анализа статистических данных: учебное пособие для студентов, обучающихся по направлениям подготовки 100700–Коммерция (торговое дело), 150100–Материаловедение и технология материалов 150400–Металлургия // В.Р. Бараз, В.Ф. Пегашкин. 2014.
5. Баранов, О.Ю. Молекулярная фитопатология: современные подходы и основные направления диагностики болезней древесных растений / О.Ю. Баранов // Сибирский лесной журнал. – 2014. – №4. – С. 42–45.
6. Башкатов, С.В. Флюоресцентная гибридизация *in situ*: практическое применение в онкоурологии / С.В. Башкатов, А.В. Севаньяев, О.Б. Карякин, Г.Ф. Михайлова, Е.В. Голуб // Онкоурология. – №3. – 2008. – С. 9–15.
7. Башкирова, И.Г. Апробация тест-систем для детекции фитоплазм яблони и груши / И.Г. Башкирова, Г.Н. Матяшова, С.К. Завриев, Д.Ю. Рязанцев, Ю.А. Шнейдер // Защита и карантин растений. – 2018. – Вып. 7. – С. 40–41.
8. Башкирова, И.Г. Выявление и идентификация возбудителей фитоплазмозов группы Apple proliferation на плодовых культурах / И.Г. Башкирова, Г.Н.

Матяшова, М.С. Гинс // Российская сельскохозяйственная наука. – 2018. – Вып. 3. – С. 10–14.

9. Блинова, С.А. Разработка набора реагентов для диагностики фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* – возбудителя почернения древесины методом ПЦР в реальном времени / С.А. Блинова, А.А. Шварцев, С.В. Сыксин, Г.Н. Бондаренко, И.Г. Башкирова, С.М. Гориславец, В.И. Рисованная, Е.П. Странишевская, В.А. Володин, Я.И. Алексеев // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55(№ 1). – С. 194–204.

10. Богоутдинов, Д.З. Анализ видового состава растений, поражаемых фитоплазмой группы столбура в России / Д.З. Богоутдинов, Н.В. Гирсова, Т.Б. Кастальева // Таврический вестник аграрной науки. – 2020. – №3. – С. 26–42.

11. Богоутдинов, Д.З. Влияние фитоплазмозов на состояние древесной растительности в России и за рубежом / Д.З. Богоутдинов, Н.В. Гирсова, Т.Б. Кастальева // Материалы Второй Всероссийской конференции с международным участием «Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике». – Москва-Красноярск. – 2019. – С. 28–30.

12. Богоутдинов, Д.З. Фитоплазменные болезни – серьезная опасность для растениеводства / Д.З. Богоутдинов, Т.Б. Кастальева, Н.В. Гирсова // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – №2(14). – С. 15–34.

13. Бондаренко, Г.Н. Методические рекомендации по выявлению и идентификации фитоплазмы Европейской желтухи плодов косточковых *Candidatus Phytoplasma prunorum* SEEMÜLLER & SCHNEIDER / Г.Н. Бондаренко, И.Г. Башкирова. – ВНИИКР, Москва, 2020. – 56 с.

14. Бондаренко, Г.Н. Методические рекомендации по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов / Г.Н. Бондаренко, Д.Л. Белкин. – М.: ВНИИКР, 2018. – 37 с.

15. Бондаренко, Г.Н. Особо опасные возбудители болезней косточковых культур рода *Candidatus phytoplasma* spp. / Г.Н. Бондаренко, И.Г. Башкирова // Карантин растений. Наука и практика. – 2018. – №4 (26). – С. 18–22.

16. Ванькова, А.А. Морфоцитологические особенности растений люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) и томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.), инфицированных микоплазмами *Acholeplasma laidlawii* / А.А. Ванькова, П.И. Иванов, Л.А. Серебрянникова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2007. – №.4. – С. 142–148.
17. Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: учебное пособие / В.А. Великов. – Саратов, 2012. – 79 с.
18. Всероссийский центр карантина растений [Электронный ресурс] // ФГБУ «ВНИИКР». – 2022. – Режим доступа: <https://vniikr.ru/>.
19. Гирсова, Н.В. Методика определения Фитоплазм с использованием молекулярных методов диагностики: ПЦР и ПДРФ / Н.В. Гирсова, Т.Б. Кастальева, К.А. Можаяева. – М., 2013. – 23 с.
20. Зинченко, В.В. Создание коллекций мутантов для исследования генетического контроля адаптации к стрессовым факторам у *Synechocystis* sp. PCC 6803 / В.В. Зинченко, В.М. Глазер, С.В. Кряжов, П.В. Лучкин, М.М. Бабыкин, Н.В. Белавина, Д.А. Лось // Экологическая генетика. – 2008. – Т. VI(№3). – С. 33–41.
21. Зорина, В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие / В.В. Зорина // – М.: «ДНК-Технология», 2012. – 80 с.
22. Каримова, Е.В. Анализ фитосанитарного риска возбудителя пролиферации яблони *Candidatus Phytoplasma mali* для территории Российской Федерации / Е.В. Каримова, Ю.А. Шнейдер, Ю.Н. Приходько; под. ред. Т.В. Артемьевой // – М.: ВНИИКР, 2018. – 92 с.
23. Кастальева, Т.Б. Таксономическая принадлежность фитоплазм, выявленных на картофеле в РФ / Т.Б. Кастальева, Н.В. Гирсова, Д.З. Богоутдинов // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32(№3). – С. 40–44.
24. Костюк, С.А. Секвенирование – методы расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК. Сообщение 1 / С.А. Костюк // Медицинские новости. – 2017. – №6. – С. 18–21.

25. Леванова, Л.А. Систематика, таксономия и классификация бактерий / Л.А. Леванова, Ю.В. Захарова // *Фундаментальная и клиническая медицина*. – 2017. – Т. 2 (№1). – С. 91–101.
26. Лежнев, Э.И. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: принципы, устройство, применение (часть 1) / Э.И. Лежнев, И.И. Попова, С.В. Кузьмин, С.М. Слащев // *Научное приборостроение*. – 2001. – Т. 11 (2). – С. 3–20.
27. Лукашева, Е.В. L-Лизин-а-оксидаза: физико-химические и биологические свойства / Е.В. Лукашева, Т.Т. Березов // *Биохимия*. – 2002. – Т. 67 (№.8). – С.1394–1401.
28. Лысак, В.В. Микробиология: учеб. пособие / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 430 с.
29. Матяшова, Г.Н. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя истощения груши *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline) / Г.Н. Матяшова, О.Н. Морозова. – М.: ВНИИКР, 2016. – 39 с.
30. Матяшова, Г.Н. Разработка и совершенствование методов диагностики фитоплазм – возбудителей болезней плодовых и ягодных культур: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.07 / Матяшова Галина Николаевна. – М., 2017. – 150 с.
31. Меженский, В.Н. Растения-индикаторы / В.Н. Меженский. – ООО «Издательство АСТ» («Сталкер»), 2004. – 76 с.
32. МСФМ 27. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 12: Фитоплазмы, 2018. – 18 с.
33. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2020 году [Электронный ресурс] // Москва. – 2021. – Режим доступа: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/nd2021.pdf>.
34. Носко, В.П. Эконометрика для начинающих (Дополнительные главы) / В.П. Носко. – М.: ИЭПП, 2005. – 379 с.
35. Приходько, Ю.Н. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя пролиферации яблони *Candidatus Phytoplasma mali*

- (Apple proliferation) / Ю.Н. Приходько, Г.Н. Матяшова. – М.: ВНИИКР, 2015. – 80 с.
36. Равин, Н.В. Геном прокариот / Н.В. Равин, С.В. Шестаков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17 (№.4/2). – С. 972–984.
37. Свиридова, Л.А. Микоплазмы-патогены растений / Л.А. Свиридова, А.А. Ванькова // Нива Поволжья. – 2012. – №.4. – С. 26–32.
38. Слипень, В.В. Молекулярная биология бактерий: учеб.-метод. пособие / В.В. Слипень, Л.П. Титов. – Минск: БГМУ, 2007. – 48 с.
39. Смирязев, А.В. Основы биоинформатики. Учебное Пособие. Издание 2-е исправленное / А.В. Смирязев, Л.К. Панкина – М., ФГОУ ВПО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2013. – 120 с.
40. Стогниенко, О.И. Столбур сахарной свеклы / О.И. Стогниенко, Е.С. Стогниенко, Ю.Н. Приходько, Т.С. Живаева // Защита и карантин растений. – 2020. – №12. – С. 3–6.
41. Чернова, О.А. Микоплазмология: учеб. пособие. / О.А. Чернова, В.М. Чернов, М.В. Трушин. – Издательство Казанского университета, 2008. – 31 с.
42. Шкаликов, В.А. Защита растений от болезней (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений) / В.А. Шкаликов, О.О. Белошапкина, Д.Д. Букреев. – М.: КолосС, 2010. – 404 с.
43. Шнейдер, Ю.А. Оценка фитосанитарных рисков вредных организмов, связанных с импортированием, экспортированием и перемещением саженцев, подвоев и черенков косточковых плодовых культур / Ю.А. Шнейдер, Ю.Н. Приходько, Е.Ю. Шнейдер, Ю.Г. Кулешова; под ред.: Т.В. Артемьевой. – М.: ВНИИКР, 2017. – 503 с.
44. Ahrens, U. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene / U. Ahrens, E. Seemüller // Phytopathology. – 1992. – Vol. 82. – P. 828–832.
45. Aldaghi, M. Preliminary evaluation of antimicrobial activity of some chemicals on *in vitro* apple shoots infected by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ / M. Aldaghi, S.

- Massart, P. Druart, A. Bertaccini, M.H. Jijakli, P. Lepoivre // *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* – 2008. – Vol. 73. – P. 335–341.
46. Al-Saady, N.A. ‘*Candidatus Phytoplasma omanense*’, associated with witches’ broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng in Oman / N.A. Al-Saady, A.J. Khan, A. Calari, A.M. Al-Subhi, A. Bertaccini // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2008. – Vol. 58(2). – P. 461–466.
47. Bai, X. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei / X. Bai, V. Correa, T. Toruno, E.-D. Ammar, S. Kamoun, S.A. Hogenhout // *Mol. Plant. Microbe. In.* – 2009. – Vol. 22. – P.18–30.
48. Bai, X. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts / X. Bai, J. Zhang, A. Ewing, S.A. Miller, A.J. Radek, D.V. Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J.W. Campbell, S.A. Hogenhout // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – P. 3682–3696.
49. Baric, S. TaqMan real-time PCR versus four conventional PCR assays for detection of apple proliferation phytoplasma / S. Baric, C. Kerschbamer, J. Dalla Via // *Plant. Mol. Biol. Rep.* – 2006. – Vol. 24. – P. 169–184.
50. Bendtsen, J.D. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. / J.D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, S. Brunak // *J. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 340. – P. 783–795.
51. Bertaccini, A. Phytoplasma and phytoplasma disease: a review of recent research / A. Bertaccini, B. Duduk // *Phytopathol. Mediterr.* – 2009. – Vol.48. – P. 355–378.
52. Bertaccini, A. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture / A. Bertaccini, B. Duduk, S. Paltrinieri, N. Contaldo // *Am. J. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5(12). – P. 26.
53. Bertolini, E. Co-operational PCR coupled with dot blot hybridization for detection and 16SrX grouping of phytoplasmas / E. Bertolini, E. Torres, A. Olmos, M.P. Martin, A. Bertaccini, M. Cambra // *Plant Pathol.* – 2007. – Vol. 56. – P. 677–682.
54. Bila, J. Coconut lethal yellowing phytoplasma disease in Mozambique / J. Bila. – 2016.

55. Biomath Calculators [Электронный ресурс] // Promega. – 2022. – Режим доступа: <https://worldwide.promega.com/>.
56. Brzin, J. Detection of apple proliferation by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees / J. Brzin, P. Ermacora, R. Osler, N. Loi, M. Raynikar, N. Petrovic // J. Plant Dis. Prot. – 2003. – Vol. 110. – P. 476–483.
57. Bulgari, D. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants / D. Bulgari, P. Casati, P. Crepaldi, D. Daffonchio, F. Quaglino, L. Brusetti, P.A. Bianco // Appl. Environ. Microb. – 2011. – Т. 77 (№.14). – С. 5018–5022.
58. Carraro, L. The recovery phenomenon in apple proliferation-infected apple trees / L. Carraro, P. Ermacora, N. Loi, R. Osler // J. Plant. Pathol. – 2004. – Vol. 86. – P. 141–146.
59. Caudwell, A. Etude sur la maladie du bois noir de la vigne: ses rapport avec flavescence dorée / A. Caudwell // Ann. Epiphyt. – 1961. – Vol. 12. – P. 241–262.
60. Center for Biological Sequence Analysis [Электронный ресурс] // Department of Health Technology. – 2020. – Режим доступа: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.
61. Centre for Agriculture and Bioscience International [Электронный ресурс] // CABI. – 2022. – Режим доступа: <https://www.cabi.org/ISC>.
62. Chapman, G.B. A light and transmission electron microscope study of a black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), affected by witches broom, and classification of the associated phytoplasma / G.B. Chapman, E.J. Buerkle, E.M. Barrows, R.E. Davis, E.L. Dally // J. Phytopathol. – 2001. – Vol. 149. – P. 589–597.
63. Christensen, N.M. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging / N.M. Christensen, M. Nicolaisen, M. Hansen, A. Schulz // Mol. Plant. Microbe. In. – 2004. – Vol. 17. – P. 1175–1184.
64. Christensen, N.M. Phytoplasmas and their interactions with hosts / N.M. Christensen, K.B. Axelsen, M. Nicolaisen, A. Schulz // Trends. Plant. Sci. – 2005. – Vol. 10 (No.11). – P. 526–535.

65. Christensen, N.M. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification / N.M. Christensen, H. Nyskjold, M. Nicolaisen // *Methods. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 938. – P. 245–252.
66. Coenye, T. Towards a prokaryotic genomic taxonomy / T. Coenye, D. Gevers, Y. Van de Peer, P. Vandamme, J. Swings // *FEMS Microbiological Review.* – 2005. – T. 29(№2). – P. 147–167.
67. Contaldo, N. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas / N. Contaldo, A. Bertaccini, S. Paltrinieri, H.M. Windsor, G.D. Windsor // *Phytopathol. Mediterr.* – 2012. – Vol. 51 (3). – P. 607–617.
68. Contaldo, N. Phytoplasma Cultivation / N. Contaldo, A. Bertaccini // In book: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – III.* – 2019.
69. Cousin M. T., Dafalla G., Demazeau E., Theveu E., Grosclaude J. In situ detection of MLOs for solanaceae “stolbur” and faba bean phyllody by indirect immunofluorescence / M.T. Cousin, G. Dafalla, E. Demazeau, E. Theveu, J. Grosclaude // *J. Phytopathol.* – 1989. – Vol. 124. – P. 71–79.
70. Credi, R. Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy / R. Credi, F. Terlizzi, L. Milanesi, R. Bondavalli, G. Cavallini, A. Montermini, D. Dradi // *Extended Abstracts 15th Meeting ICVG.* – 2006. – P. 182–183.
71. Daire, X. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA / X. Daire, D. Clair, W. Reinert, E. Boudon-Padieu // *Eur. J. Plant. Pathol.* – 1997. – T. 103(№6). – C. 507–514.
72. Das, A.K. Detection of brinjal little leaf phytoplasma in situ by light and fluorescence microscopy / A.K. Das, D.K. Mitra // *Indian Phytopathology.* – 2004. – Vol. 57. – P. 242–244.
73. Deng, S. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes / S. Deng, C. Hiruki // *J. Microbiol. Meth.* – 1991. – Vol. 14. – P.53–61.
74. Dickinson, M. *Phytoplasma: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* / M. Dickinson, J. Hodgetts. // *Humana Press.* – 2013. – Vol. 938. – P. 421.

75. DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс] // DDBJ. – 2022. – Режим доступа: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>.
76. Doi, M. Mycoplasma or PLT-grouplike organism found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellow, or paolownia witches' broom / M. Doi, M. Tetranaka, K. Yora, H. Asuyama // Ann. phytopathol. Soc. Jpn. – 1967. – Vol. 33(4). – P. 259–266.
77. Doyle, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Focus. – 1990. – Vol. 12. – P. 13–15.
78. Duduk, B. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? / B. Duduk, A. Bertaccini // Phytopathogenic Mollecutes. – 2011. – P. 3–13.
79. European Nucleotide Archive [Электронный ресурс] // EMBL. – 2021. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>.
80. Favali, M.A. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations / M.A. Favali, R. Musetti, S. Benvenuti, A. Bianchi, L. Pressacco // Protoplasma. – 2004. – Vol. 223. – P. 45–51.
81. Fernández, F.D. Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina / F.D. Fernández, N.G. Meneguzzi, F.A. Guzmán, D.S. Kirschbaum, V.C. Conci, C.F. Nome, L.R. Conci // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Vol. 65. – P. 2741–2747.
82. Firrao, G. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus phytoplasma*' / G. Firrao, K. Gibb, C. Streten // J. Plant. Pathol. – 2005. – Vol. 87(4). – P. 249–263.
83. Fránová, J. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/PFLP analysis / J. Fránová // Bull. Insectology. – 2011. – Vol. 64. – P. 287–288.
84. Fránová, J. Molecular tools in COST FA0807 Action. Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact / J. Fránová, A. Bertaccini, B. Duduk // Bologna: IPWG–International Phytoplasma Working Group. – 2014. – P. 179–185.

85. Freundt, E. A. Minutes of first meeting of the Subcommittee on taxonomy of the Mycoplasmata / E.A. Freundt, D.G. Edward // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 1967. – T. 17(№.2). – C. 105–109.
86. Garcia-Chapa, M. Seasonal detection of Pear decline phytoplasma by nested PCR in different pear cultivars / M. Garcia-Chapa, M.A. Medina, M.A. Viruel, A. Lavina, A. Battle // *Plant. Pathol.* – 2003. – Vol. 52. – P. 513–520.
87. Garnier, M. Mycoplasmas, plants, insect vectors: A matrimonial triangle / M. Garnier, X. Foissac, P. Gaurivaud, F. Laigret, J. Renaudin, C. Saillard, J.M. Bové // *Cr. Acad. Sci. III-VIE.* – 2001. – Vol. 324(10). –P. 923–928.
88. Gasparich, G.E. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade / G.E. Gasparich, R.F. Whitcom, D. Dodge, F.E. French, J. Glass, D.L. Williamson // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2004. – Vol. 54. – P. 893–918.
89. Girsova, N.V. Diversity of phytoplasmas infecting cultural crops and weeds in Russia and their potential vectors / N.V. Girsova, T.B. Kastalyeva, K.A. Mozhaeva, Yu.I. Meshkov, R.A. Owens, I.-M. Lee // *Ibid.* – 2010. – P. 148.
90. Green, M.L. East and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction / M.L. Green, D.A. Thompson, D.J. Mac Kenzie // *Plant Dis.* – 1999. – Vol. 83. – P. 482–485.
91. Heinrich, M. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas / M. Heinrich, S. Botti, L. Caprara, W. Arthofer, S. Strommer, V. Hanzer, H. Katinger, A. Bertaccini, M. Laimer // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2001. – Vol. 19. – P. 169–179.
92. Hodgetts, J. Phytoplasma Phylogeny and Detection Based on Genes other than 16S rRNA / J. Hodgetts, M. Dickinson // *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors.* – 2010. – P. 93–63.
93. Hogenhout, S.A. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt? // *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vector* / S.A. Hogenhout, M.Š. Musić // UK by MPG Books Group. – 2010. – P. 19–36.

94. Howell, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts / C.R. Howell // *Plant Dis.* – 2003 - Vol. 87 – P. 4–10.
95. Hren, M. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics / M. Hren, L. Boben, A. Rotter, P. Kralj, K. Gruden, M. Ravnkar // *Plant Pathol.* – 2007. – Vol. 56. – P. 785–796.
96. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. Minutes of the interim meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 43. – P. 394–397.
97. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group. Correspondence G. Firrao. ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2004. – Vol. 54. – P. 1243–1255.
98. Ishiie, T. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease / T. Ishiie, Y. Doi, K. Yora, H. Asuyama // *Japanese Journal of Phytopathology.* – 1967. – T. 33(№.4). – C. 267–275.
99. Johansson, K.-E. Taxonomy of Mollicutes. In: S. Razin, Hermann R. (eds.) *Academic/Plenum Kluwer, London* / K.-E. Johansson, B. Pettersson // *Molecular Biology and Pathology of Phytoplasmas.* – 2002. – P. 1–30.
100. Kakizawa, S. Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas / S. Kakizawa, K. Oshima, H.Y. Jung, S. Suzuki, H. Nishigawa, R. Arashida, S. Miyata, M. Ugaki, H. Kishino, S. Namba // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – P. 3424–3428.
101. Kakizawa, Y. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery / Y. Kakizawa, S. Furukawa, K. Kataoka // *J. Control. Release.* – 2004. – T. 97(№.2). – C. 345–356.
102. Kirkpatrick B.C. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens / B.C. Kirkpatrick // *The Prokaryotes.* – 1992. – Vol. 4. – P. 4050–4067.

103. Kirkpatrick, B.C. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism / B.C. Kirkpatrick, D.C. Stenger, T.J. Morris, A. Purcell // *Science*. – 1987. – Vol. 238. – P. 197–200.
104. Kollar, A. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases / A. Kollar, E. Seemüller // *J. Phytopathol.* – 1989. – Vol. 127. – P. 177–186.
105. Kollar, A. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants / A. Kollar, E. Seemüller, F. Bonnet, C. Saillard, J.M. Bove // *Phytopathology*. – 1990. – Vol. 80. – P. 1346–1351.
106. Kolombet, L.V. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum* / L.V. Kolombet, S.K. Zhigletsova, N.I. Kosareva, E.V. Bystrova, V.V. Derbyshev, S.P. Krasnova, D. Schisler // *World J. Microb. Biot.* – Vol. 24(N 1). – 2008. – P. 123–131.
107. Lebsky, V. Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico / V. Lebsky, J. Hernandez-Gonzalez, G. Arguello-Astorga, Y. Cardenas-Conejo, A. Poghosyan // *Bull. Insectology*. – 2011. – Suppl. 64. – P. 55–56.
108. Lee, I.-M. ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases / I.-M. Lee, D.E. Gundersen, R.E. Davis, K.D. Bottner, C. Marcone, E. Seemüller // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2004b. – Vol. 54. – P. 1037–1048.
109. Lee, I.-M. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows / I.-M. Lee, M. Martini, C. Marcone, S.F. Zhu // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2004a. – Vol. 54. – P. 337–347.
110. Lee, I.-M. Genetic interrelatedness among Clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses / Lee I.-M., R.E. Davis, C. Hiruki // *Appl. Environ. Microb.* – 1991. – Vol. 57. – P. 3565–3569.

111. Lee, I.-M. Mycoplasmas which infect insects and plants / I.-M. Lee, R.E. Davis // *Mycoplasmas*. – 1992. – P. 379–390.
112. Lee, I.-M. Phytoplasma, phytopathogenic mollicutes / I.-M. Lee, R.E. Davis, D.E. Gundersen-Rindal // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – Vol. 54(1). – P. 221–255.
113. Lee, I.-M. Prospects of Multiple Gene-based Systems for Differentiation and Classification of Phytoplasmas / I.-M. Lee, Y. Zhao, R.E. Davis // *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. – 2010. – P. 51–63.
114. Lee, I.-M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences / I.-M. Lee, D.E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis, I.M. Bartoszyk // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 48. – P. 1153–1169.
115. Lee, I.-M. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms / I.-M. Lee, R.W. Hammond, R.E. Davis, D.E. Gundersen // *Phytopathology*. – 1993. – Vol. 83. – P. 834–842.
116. Li, R. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogen / R. Li, R. Mock, Q. Huang, J. Abad, J. Hartung, G. Kinard // *J. Virol. Methods*. – 2008. – Vol. 154. – P. 48–55.
117. Lorenz, K.H. Detection of apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA / K.H. Lorenz, B. Schneider, U. Ahrens, E. Seemüller // *Phytopathology*. – 1995. – Vol. 85(7). – P. 771–776.
118. Maramorosch, K. Historical reminiscences of phytoplasma discovery / K. Maramorosch et al. // *Bull. Insectology*. – 2011. – T. 64. – №. Supplement.
119. Martin, R. Four Spanish isolates of pear decline phytoplasma are related to other European phytoplasmas of the apple proliferation group / R. Martin, G. Carazo, C. Arribas, I. Colino, R. Santiago, C. De Blas // *J. Phytopathol.* – 2001. – Vol. 149. – P. 481–484.
120. Martini, M. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas / M. Martini, I.-M. Lee, K.D. Bottner, Y. Zhao, S. Botti,

- A. Bertaccini, N.A. Harrison, L. Carraro, C. Marcone, R. Osler // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 2037–2051.
121. Marzachi, C. Relative quantification of phytoplasma in their plant and insect hosts: a real time PCR based method to quantify CY (16Sr I) phytoplasma in infected daisy and leafhopper vector / C. Marzachi, D. Bosco // *Mol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 30. – P. 117–127.
122. Mayer, C.J. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor / C.J. Mayer, A. Vilcinskas, J. Gross // *J. Chem. Ecol.* – 2008a. – Vol. 34. – P. 1045–1049.
123. McCoy, R.E. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms / R.E. McCoy, A. Caudwell, C.J. Chang et al. // *The Mycoplasmas.* – 1989. – Vol. 5. – P. 545–640.
124. McLarty, H.R. Killing of pear trees / H.R. McLarty // *Ann. Rpt. Canad. Plant Dis. Survey.* – 1948. – Vol. 28. – P. 77.
125. Mehle, N. Real-time PCR assays for specific detection of Three phytoplasmas from apple proliferation group / N. Mehle, P. Nikolic, K. Gruden, M. Ravnkar, M. Dermastia // *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in molecular biology.* – 2013. – Vol. 938. – P. 269–281.
126. Menne, K.M. A comparison of signal sequence prediction methods using a test set of signal peptides / K.M. Menne, H. Hermjakob, R. Apweiler // *Bioinformatics.* – 2000. – T. 16(№8). – P. 741–742.
127. Music, M.S. The genome of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ strain SA-1 is highly dynamic and prone to adopting foreign sequences / M.S. Music, I. Samarzija, S.A. Hogenhout, M. Haryono, S.-T. Cho, C.-H. Kuo // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2019. – Vol. 42(2). – P. 117–127.
128. Namba, S. Molecular and biological properties of phytoplasmas / S. Namba // *P. Jpn. Acad. B-Phys.* – 2019. – Vol. 95(7). – P. 401–418.
129. Nejat, N. Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present / N. Nejat, G. Vadamalai // *J. Plant. Dis. Protect.* – 2013. – Vol. 120(1). – P. 16–25.

130. Nichols, C.W. Pear decline in California / C.W. Nichols, H. Schneider, H.J. O'Reilly, T.A. Shalla, W.H. Griggs // California Department of Agriculture. – 1960. – Vol. 49. – P. 186–192.
131. Nikolic, P. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group / P. Nikolic, N. Mehle, K. Gruden, R. Ravnikar, M. Dermastia // Mol. Cell. Probe. – 2010. – Vol. 24(5). – P. 303–309.
132. Nipah, J.O. Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana / J.O. Nipah, P. Jones, M.J. Dickinson // Plant Pathol. – 2007. – Vol. 56. – P. 777–784.
133. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator [Электронный ресурс] // Oligo Calc. – 2022. – Режим доступа: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
134. Oshima, K. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas / K. Oshima, K. Maejima, S. Namba // Frontiers in Microbiology. – 2013. – Vol. 4. – P. 230.
135. Phytoplasma Resource Center [Электронный ресурс] // Molecular Plant Pathology Laboratory. – 2021. – Режим доступа: <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/hosted>.
136. Picard, C. Recommended regulated non-quarantine pests (RNQP s), associated thresholds and risk management measures in the European and Mediterranean region / C. Picard, T. Afonso, A. Benko-Beloglavac, O. Karadjova, S. Matthews-Berry, S.A. Paunovic, M. Pietsch, P. Reed, D.J. van der Gaag, M. Ward // EPPO Bulletin. – 2018. – T. 48(№.3). – P. 552–568.
137. PM 1/2 (28) EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2019. – P. 18.
138. PM 7/133 (1). Generic detection of phytoplasmas // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2018. – Vol. 48(3). – P. 414–424.
139. PM 7/62 (2). *Candidatus* Phytoplasma mali, *Ca. P. pyri* and *Ca. P. prunorum* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin – 2017. – Vol. 47(2). – P. 146–163.
140. PM 7/62 (3). *Candidatus* Phytoplasma mali, *Ca. P. pyri* and *Ca. P. prunorum* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2020. – Vol. 50(1). – P. 69–85.

141. Poghosyan, A.V. Possible phytoplasma disease in papaya (*Carica papaya* L.) from Baja California Sur: diagnosis by scanning electron microscopy / A.V. Poghosyan, V.K. Lebsky, M. Arce-Montoya, L. Landa // *J. Phytopathol.* – 2004. – Vol. 152. – P. 376–380.
142. Quaglino, F. '*Candidatus* Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants / F. Quaglino, Y. Zhao, P. Casati, D. Bulgari, P.A. Bianco, W. Wei, R.E. Davis // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* –2013. – Vol. 63. – P. 2879–2894.
143. Razin, S. Molecular biology and pathology of mycoplasmas / S. Razin, D. Yogeve, Y. Naot // *Microbiol. Mol. Biol. R.* – 1998. – Vol. 62. – P. 1094–1156.
144. Rottem, S. Beware of mycoplasmas / S. Rottem, M.F. Barile // *Trends Biotechnol.* – 1993. – Vol. 11(№4). – P. 143–151.
145. Rui, D. La virosi degli «scopazzi del melo» nel Veronese / D. Rui, R. Ciferri, E. Refatti // *Notiziario delle Malattie delle Piante.* – 1950. – Vol. 13. – P. 7–11.
146. Schneider, B. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA / B. Schneider, C. Marcone, M. Kampmann, A. Ragozzino, W. Lederer, M.T. Cousin, E. Seemüller // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1997. – Vol. 103. – P. 675–686.
147. Schneider, B. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas / B. Schneider, E. Seemüller, C.D. Smart, B.C. Kirkpatrick // *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology.* – 1995. – Vol. 1. – P. 369–380.
148. Schneider, B. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes / B. Schneider, E. Seemüller // *Appl. Environ. Microb.* – 1994. – Vol. 60(No.9). – P. 3409–3412.
149. Schneider, G. Advances in the prediction of protein targeting signals / G. Schneider, U. Fechner // *Proteomics.* – 2004. – T. 4(№6). – C. 1571–1580.
150. Seemüller, E. '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear

- decline and European stone fruit yellows, respectively / E. Seemüller, B. Schneider // Int. J. Syst. Evol. Micr. – 2004. – Vol. 54. – P. 1217–1226.
151. Seemüller, E. Current status of molecular classification of the phytoplasmas / E. Seemüller, C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino, M. Göschl // J. Plant Pathol. – 1998. – Vol. 80. – P. 3–26.
152. Seemüller, E. Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*', the apple proliferation agent / E. Seemüller, B. Schneider // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97. – P. 964–970.
153. Seemüller, E. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA / E. Seemüller, B. Schneider, R. Mäurer, U. Ahrens, X. Daire, H. Kison, K.-H. Lorenz, G. Firrao, L. Avinent, B.B. Sears, E. Stackebrandt // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – Vol. 44. – P. 440–446.
154. Smirnova, I.P. Antibacterial activity of L-lysine- $\alpha$ -oxidase from the Trichoderma / I.P. Smirnova, E.V. Karimova, Y.A. Shneider // B. Exp. Biol. Med+. – 2017. – Vol. 163(6). – P. 777–779.
155. Suzuki, S. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity / S. Suzuki, K. Oshima, S. Kakizawa, R. Arashida, H.Y. Jung, Y. Yamaji, H. Nishigawa, M. Ugaki, S. Namba // P. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 4252–4257.
156. The European and Mediterranean Plant Protection Organization [Электронный ресурс] // EPPO. – 2022. – Режим доступа: <https://gd.eppo.int>.
157. The National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс] // NCBI. – 2022. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
158. T<sub>m</sub> Calculator [Электронный ресурс] // Thermo Fisher Scientific. – 2022. – Режим доступа: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home.html>.
159. Torres E. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' and '*Candidatus Phytoplasma pyri*': preliminary results / E. Torres // Bull. Insectology. – 2011. – Vol. 64. – P. 281–284.

160. Tran-Nguyen, L.T.T. Comparative genome analysis of ‘*Ca. P. australiense*’ (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ strains OY-M and AY-WB / L.T.T. Tran-Nguyen, M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt, K.S. Gibb // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190. – P. 3979–3991.
161. Vandamme, P. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics / P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. Devos, K. Kersters, J. Swings // *Microbiology Review.* – 1996. – Vol. 60. – P. 407–438.
162. Wei, W. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups / W. Wei, R.E. Davis, I.-M. Lee, Y. Zhao // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* – 2007. – Vol. 57. – P. 1855–1867.
163. Weintraub, P.G. Insect vectors of phytoplasmas / P.G. Weintraub, L. Beanland // *Annu. Rev. Entomol.* – 2006. – Vol. 51. – P. 91–111.
164. Whitcomb, R.F. Introduction: Mollicutes, Hosts, and Evolution / R.F. Whitcomb // *Tree Mycoplasmas and Mycoplasma Disease* / Edited by C. Hiruki. – 1988. – P. 1–16.
165. Woese, C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree / C.R. Woese // *P. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8392–8396.
166. Woodbridge, C.G. Pear decline in the Pacific Northwest / C.G. Woodbridge, E.C. Blodgett, T.O. Diener // *Plant Dis. Rep.* – 1957. – Vol. 41. – P.569–572.
167. Yadav, A. Diversity studies and taxonomic assignment of SCSGS phytoplasma / A. Yadav, D. Thesis // *Studies on Sugarcane Grassy Shoot Disease.* – 2013. – P. 76–106.
168. Yvon, M. Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ / M. Yvon, G. Thébaud, R. Alary, G. Labonne // *Mol. Cell. Probe.* – 2009. – Vol. 23. – P. 227–234.
169. Zhao, Y. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII) / Y. Zhao, W. Wei, I.-M. Lee, J. Shao, X. Suo, R.E. Davis // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59(№10). – P. 2582–2593.

170. Zhao, Y. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups / Y. Zhao, R.E. Davis // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* –2016. – Vol. 66. – P. 2121–2123.
171. Zhao, Y. Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy / Y. Zhao, W. Wei, R.E. Davis, I.-M. Lee // *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors.* – 2010. – P. 64–92.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А



**Рисунок А.1.** Микроорганизм *Candidatus Phytoplasma mali* из группы Apple proliferation вызывает следующие симптомы заболевания пролиферации яблони: 1) ветвящиеся побеги (фото D.R. Blystad, Bioforsk, 2011); 2) «ведьмины метлы» (фото С.Ф. Bondaz, Plant Protection Unit of Val d'Aosta Region, IT.)



**Рисунок А.2.** Зараженные листья (слева) фитоплазмой *Candidatus Phytoplasma mali* имеют меньшие размеры и большие прилистники у основания стебля, чем обычные (справа) листья (фото Dr. Federico Bondaz, Plant Protection Unit of Val d'Aosta region)

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

В настоящее время микроорганизм *Candidatus Phytoplasma mali* из группы Apple proliferation отмечен в следующих странах Европы: Австрия, Албания, Бельгия, Болгария, Босния и Герцеговина, Венгрия, Германия, Греция, Испания, Италия, Литва, Молдова, Нидерланды, Норвегия, Польша, Республика Беларусь, Республика Сербия, Россия, Румыния, Словакия, Словения, Турция, Украина, Финляндия, Франция, Хорватия, Чешская Республика, Швейцария (gd.eppo.int; cabi.org).

Фитоплазма *Candidatus Phytoplasma pyri* из группы Apple proliferation выявлена в следующих странах Европы: Австрия, Азербайджан, Албания, Бельгия, Болгария, Босния и Герцеговина, Великобритания, Венгрия, Германия, Греция, Испания, Италия, Молдова, Нидерланды, Норвегия, Польша, Португалия, Республика Беларусь, Республика Сербия, Словакия, Словения, Турция, Франция, Хорватия, Чешская Республика, Швейцария (gd.eppo.int; cabi.org).

Растительный патоген *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation присутствует в следующих странах Европы: Австрия, Азербайджан, Албания, Бельгия, Болгария, Босния и Герцеговина, Великобритания, Венгрия, Германия, Греция, Испания, Италия, Польша, Республика Беларусь, Республика Сербия, Румыния, Словения, Турция, Франция, Хорватия, Чешская Республика, Швейцария (gd.eppo.int; cabi.org).

Фитопатоген *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbug детектирован в следующих странах Европы: Армения, Австрия, Азербайджан, Албания, Босния и Герцеговина, Болгария, Венгрия, Германия, Греция, Грузия, Италия, Испания, Польша, Республика Сербия, Россия, Украина, Словения, Словакия, Северная Македония, Турция, Франция, Хорватия, Чешская Республика, Швейцария (gd.eppo.int; cabi.org).

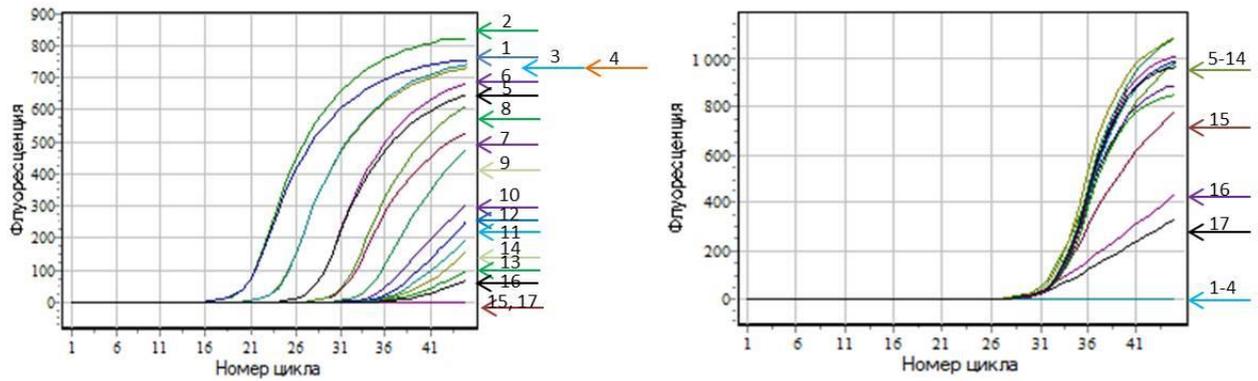
## ПРИЛОЖЕНИЕ В

**Таблица В.1. Состав разрушающего и экстрагирующего буферов**

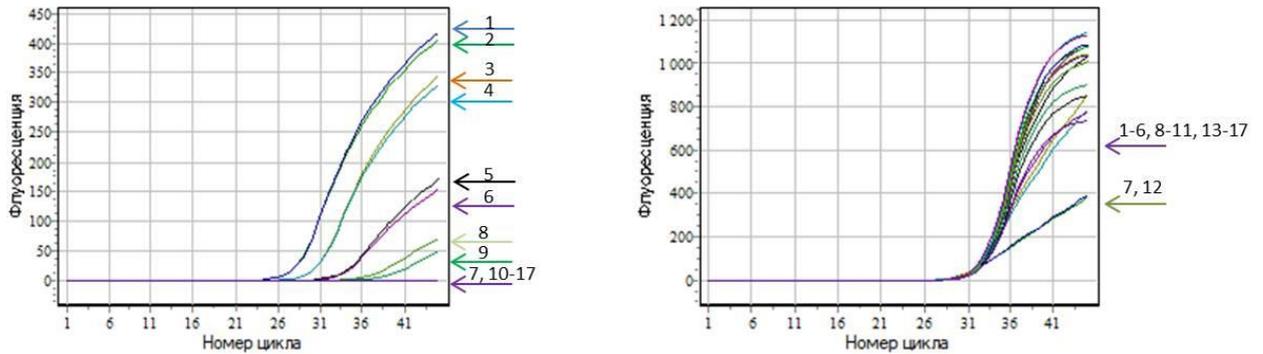
Буфер	Компонент	Расчет, г
Разрушающий (Grinding buffer) на 1 литр	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	21,7
	$KH_2PO_4$	4,1
	Сахароза (Sucrose)	100
	БСА (BSA) (v)	1,5
	ПВП (PVP)-15/ ПВП (PVP)-10	20
	Аскорбиновая кислота (Ascorbic acid)	5
Экстрагирующий (СТАВ buffer) на 100 мл	ЦТАБ (СТАВ)	2,5
	ПВП (PVP)-30/(PVP)-40	1
	NaCl	8,2
	ЭДТА (EDTA)-Na <sub>2</sub>	0,74
	Трис (Tris)	1,21
	2-меркаптоэтанол (2-Mercaptoethanol)	200 (мкл)

Компоненты буферов растворяют в стерильной дистиллированной воде до нужного объема. Для буферов автоклавирование не требуется. Для разрушающего буфера оптимальный показатель pH составляет 7,6; для экстрагирующего буфера pH – 8,0. Хранение буфера Grinding buffer осуществляется в морозильной камере при температуре от минус 20 до минус 80°C; буфера СТАВ buffer при комнатной температуре в защищенном от света месте (Приходько, Матяшова, 2015; Матяшова, Морозова, 2016).

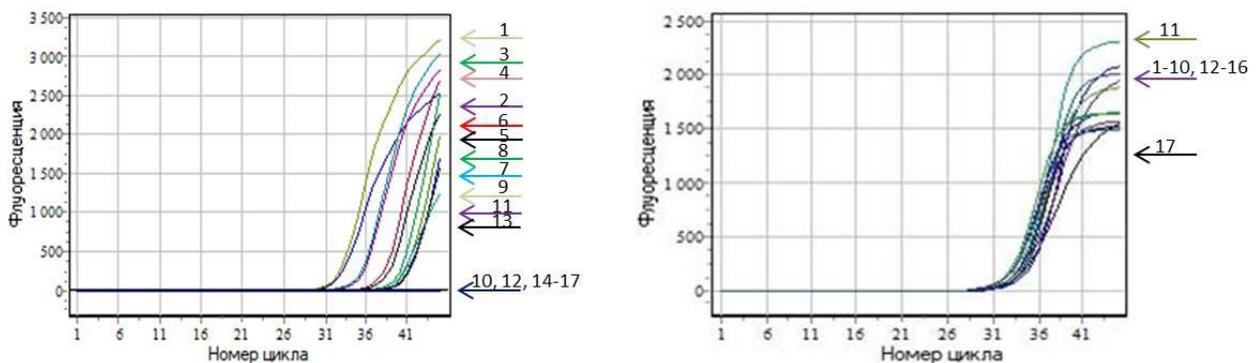
## ПРИЛОЖЕНИЕ Г



**Рисунок Г.1.** Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* для изучения аналитической чувствительности теста UNI2 (серия разведений ДНК соответствует № п/п в таблице 10): канал ROX (слева) – микроорганизм, канал HEX (справа) – внутренний положительный контроль



**Рисунок Г.2.** Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma rugi* для изучения аналитической чувствительности теста UNI2 (серия разведений ДНК соответствует № п/п в таблице 11): канал ROX (слева) – микроорганизм, канал HEX (справа) – внутренний положительный контроль



**Рисунок Г.3.** Использование ДНК *Candidatus Phytoplasma prunorum* для изучения аналитической чувствительности теста UNI2 (серия разведений ДНК соответствует № п/п в таблице 12): канал ROX (слева) – микроорганизм, канал HEX (справа) – внутренний положительный контроль

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
 ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
 ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА  
 РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
 (ФГБУН ИБХ РАН)  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ»  
 (ФГБУ «ВНИИКР»)

Диагностика ряда карантинных фитопатогенов  
 методом полимеразной цепной реакции  
 с флуоресцентной детекцией результатов  
 с использованием диагностических наборов производства  
 ООО «АгроДиагностика»

(МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ)

Рассмотрено и одобрено  
 Ученым Советом ФГБУН ИБХ РАН  
 4 марта 2020 г. Протокол № 2

Председатель Ученого Совета,  
 академик А.Г. Габиев



Москва 2020

Федеральная служба по ветеринарному  
 и фитосанитарному надзору

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ»  
 (ФГБУ «ВНИИКР»)

Инв. № 75-2020 МР ВНИИКР

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
 ПО ВЫЯВЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ  
 ФИТОПЛАЗМЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЖЕЛТУХИ  
 ПЛОДОВ КОСТОЧКОВЫХ *CANDIDATUS PHYTOPLASMA  
 PRUNORUM SEEMÜLLER & SCHNEIDER*



Московская обл., р.п. Быково 2020