

*На правах рукописи*

**Башкирова Ида Геннадьевна**

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

1.5.11. Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», медицинский институт, кафедра биохимии имени академика Березова Т.Т.

**Научный руководитель:**

**Смирнова Ирина Павловна**, доктор биологических наук, заслуженный профессор МИ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

**Официальные оппоненты:**

**Джалилов Февзи Сеид-Умерович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева»

**Милюкова Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

**Ведущая организация:**

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБФМ РАН)

Защита диссертации состоится « 26 » сентября 2023 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.010 в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах <https://www.rudn.ru/science/dissovet> и <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета ПДС 0300.010  
кандидат медицинских наук, доцент

Подопригора Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Фитоплазмы являются одними из наиболее опасных микроорганизмов для растений. 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, они нарушают симбиотическое равновесие экосистем (R.E. McCoy et al., 1989; I.-M. Lee et al., 2000).

Фитоплазмы являются большой группой внутри класса Mollicutes. Другими представителями данного класса является род *Spiroplasma*, несколько видов из рода *Acholeplasma*, которые близки к таким бактериям, как *Bacillus*, *Clostridium* и *Streptococcus* (Л.А. Свиридова, А.А. Ванькова 2012; Н.В. Гирсова и др., 2013). Микроорганизмы *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation (16SrX) и *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur (16SrXII) являются одними из наиболее опасных и экономически значимых патогенов для плодово-ягодных культур не только для Российской Федерации, но и для других стран (С. Picard et al., 2018; gd.eppo.int).

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

Современные молекулярно-генетические методы активно проникают в различные области наук, в частности, в микробиологию. На современном этапе изучения выявления, диагностики и идентификации фитоплазм выбрана филогенетическая классификация этих микроорганизмов, основанная на использовании молекулярно-генетических методов. Она занимает в изучении идентификации микроорганизмов приоритетное направление.

В основе филогенетической идентификации фитоплазм лежит определение нуклеотидной последовательности участков 16S-23S рРНК генов (С.Р. Woese, 2000). Наличие этого фрагмента позволяет провести выявление и определение наличия фитоплазмы, с последующим секвенированием, позволяющим установить вид микроорганизма.

Распространение опасных фитопатогенных микроорганизмов чаще всего связано с импортом зараженного посадочного растительного материала.

Идентификация микроорганизмов является основополагающим звеном в научных исследованиях.

**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 из 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 (К.Н. 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 работы:** 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 pyri* 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 рРНК 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 Phytoplasma 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 (Пущино, 2020); 10-й международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов» (Краснодар, 2021); Международной научной конференции «Агроботехнология-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».

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы**

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 разных источников с целью отработки методов молекулярно-генетической диагностики (табл. 1). Для изучения специфичности

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

Исследовали отечественный и зарубежный растительный материал *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. Сбор растительного материала проводили при визуальном осмотре на наличие симптомов, характерных для заражения фитоплазмами из групп Apple proliferation (*Ca. P. mali*, *Ca. P. pyri*, *Ca. P. prunorum*) и Stolbur (*Ca. P. solani*). Учитывая неравномерное распределение патогена по растениям, для тестирования отбирали сборные образцы из листьев, побегов и корневой системы.

Таблица 1. ДНК культур, используемых в работе

№ п/п	Название микроорганизма	Источник (коллекция)	Зараженный растительный материал
1	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma mali</i>	Материалы IVIA, Испания	<i>Malus domestica</i> Borkh.
2	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma mali</i>	Материалы Бондаренко Г.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Malus</i> spp.
3	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma pyri</i>	Материалы IVIA, Испания	<i>Pyrus communis</i> L.
4	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma pyri</i>	Материалы Бондаренко Г.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Pyrus communis</i> L.
5	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma prunorum</i>		<i>Prunus armeniaca</i> L.
6	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma prunorum</i>	Материалы Башкировой И.Г., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Prunus persica</i> L.
7	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma solani</i>	Материалы ООО «Синтол»	<i>Vitis vinifera</i> L.
8	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma rubi</i>	Материалы Бондаренко Г.Н., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Rubus idaeus</i> L.
9	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma trifolii</i>	Материалы ФГБНУ «ВНИИФ»	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
10	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma convolvuli</i>	Материалы Башкировой И.Г., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
11	<i>Candidatus</i> <i>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> (штамм CFBR8082)		Чистая культура
15	Неинфицированный материал	Материалы Башкировой И.Г., ФГБУ «ВНИИКР»	<i>Malus domestica</i> Borkh.
16	Неинфицированный		<i>Pyrus communis</i> L.



	материал		
17	Неинфицированный материал		<i>Prunus armeniaca</i> L.
18	Неинфицированный материал		<i>Vitis vinifera</i> L.

Проводили сравнение эффективности различных методов экстракции ДНК фитоплазм с использованием классической методики Doyle & Doyle (Doyle, Doyle, 1990; РМ 7/62 (3), 2020); набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США); трех наборов реагентов «ЦитоСорб/СytoSorb», «СОРБ-ГМО-Б», «ФитоСорб» компании ООО «Синтол» (Россия) и двух комплектов реагентов «Проба-ГС», «Проба-НК» компании ООО «АгроДиагностика» (Россия). Для отработки методов выделения ДНК фитоплазм в работе использовали зараженный фитоплазмой *Candidatus Phytoplasma pyri* растительный материал *Pyrus communis* L. Проверку качества выделения ДНК микроорганизма проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ» (ООО «Синтол», Россия), который позволяет одновременно специфичный для *Candidatus Phytoplasma pyri* фрагмент гена *aceF* (по каналу флуоресценции FAM), а также внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу флуоресценции HEX (R6G).

После определения оптимального метода выделения ДНК, в экспериментах проводили отработку и оптимизацию методов диагностики фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с помощью ПЦР на положительных образцах. В работе по диагностике фитоплазм из групп Apple proliferation с помощью метода ПЦР, проводили изучение аналитических характеристик олигонуклеотидов, разработанных на участки 16S-23S рРНК гена. Повторность в опытах двукратная. В исследованиях использовали олигонуклеотиды (праймеры и зонды), разработанные на участок 16S-23S гена рРНК и межгенный участок 16S-23S гена. Универсальные олигонуклеотиды: UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe (N.M. Christensen et al., 2013); P1 (S. Deng, C.Hiruki, 1991)/P7 (B. Schneider et al., 1995); fU5/rU3 (K.H. Lorenz et al., 1995). Праймеры ESFYf/ESFYr (M. Yvon et al., 2009) для видовой идентификации *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation. Для определения аналитической чувствительности проводили серию последовательных разведений образца от  $10^{-1}$  (1/10) до  $10^{-7}$  (1/10000000) в 2 повторностях.

В исследованиях проводили апробацию коммерческих наборов отечественного производства: «*Candidatus Phytoplasma mali*-РВ»; «*Candidatus Phytoplasma pyri*-РВ»; «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» (ООО «Синтол») и «Фитоплазма пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*)»; «Фитоплазма истощения груши (*Candidatus Phytoplasma pyri*)» (ООО «АгроДиагностика»).

Для оптимизации проведения метода ПЦР, в работе использовали 12 готовых реакционных смесей (микс для ПЦР или mix) отечественных производителей: 5Х

qPCRMix-HS; 5X qPCRMix-HS + high ROX; 5X qPCRMix-HS (UDG); 5X ScreenMix; 5X ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген»); 5X Mas<sup>CFG</sup>Taq Mix-2025; 5X Mas<sup>CFE</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 (ЗАО «Диалат Лтд») и 2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green (ООО «Синтол»).

В исследованиях проводили определение оптимальной температуры отжига универсальных праймеров fU5/rU3, которые используют для видовой идентификации фитоплазм методом секвенирования.

Филогенетический анализ фитоплазм осуществляли методом секвенирования – определение нуклеотидной последовательности генома микроорганизма или его фрагмента (В.В. Зорина, 2019). Биоинформатический анализ и обработку полученных данных методом секвенирования осуществляли через программное обеспечение UGENE (Россия), AliView (Швеция), BioEdit (США) и с помощью международной базы данных NCBI.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 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.

Для определения зон возможного распространения фитоплазм и проведения их идентификации, в работе проанализировано 2939 образцов отечественного и импортного растительного материала (рис. 1 и 2).

На территории Российской Федерации отобран и проанализирован биоматериал из 10 областей (Белгородская, Брянская, Воронежская, Калужская, Ленинградская, Московская, Новгородская, Тамбовская, Тверская, Тульская), из 3 краев (Краснодарский, Приморский, Хабаровский) и 2 республик (Дагестан, Крым). Наибольшее количество образцов растений отобрано из Московской области (20,4%), из Республики Крым (15,7%) и из Тульской области (11,3%).

Также исследовали пораженные растения из зарубежных стран: Австрия, Бельгия, Германия, Греция, Испания, Италия, Молдова, Нидерланды, Польша,

Сербия и Франция. Наибольшее количество импортного биоматериала проанализировано из Италии, что составило 41,2%, из Франции (14,8%) и Нидерландов (9,7%).



Рисунок 1. Исследование пораженного растительного материала на наличие фитоплазм из различных регионов Российской Федерации в период 2018 – 2021 гг.



Рисунок 2. Исследование пораженного растительного материала на наличие фитоплазм из различных регионов зарубежных стран в период 2018 – 2021 гг.

Нами были выбраны основные растения-хозяева и возможные растения, которые могут быть резерваторами фитоплазменной инфекции, для исследуемых видов фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. На рисунке 3 показано

суммарное количество и видовое разнообразие проанализированного отечественного и импортного растительного материала: *Malus* spp. – 699 штук; *Pyrus* spp. – 162; *Cydonia oblonga* L. – 44; *Vitis vinifera* L. – 951; *Prunus* spp. – 708; *Solanum* spp. – 297; другие виды – 78.

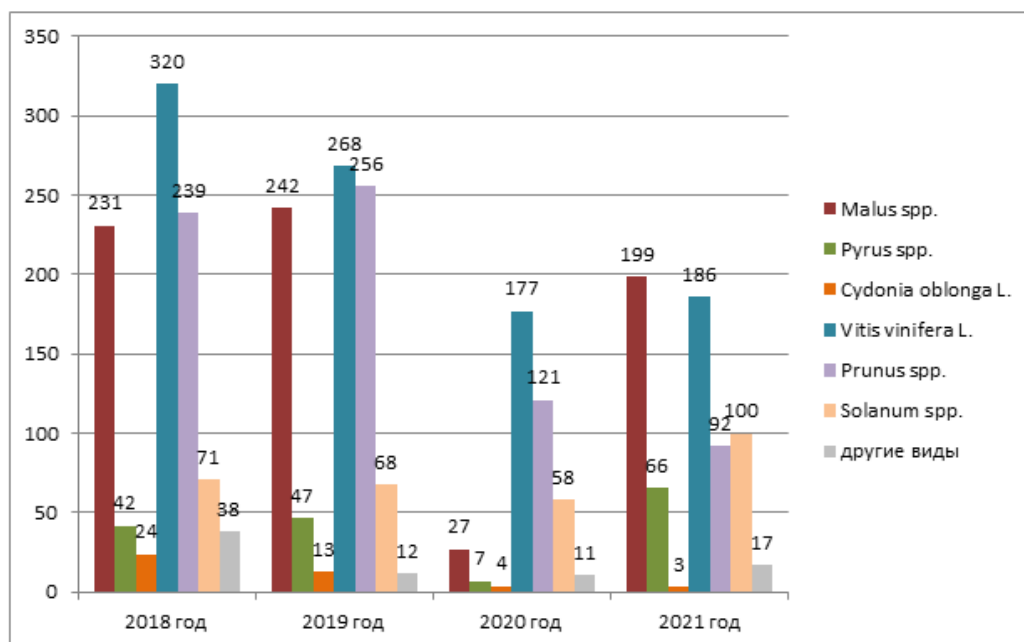


Рисунок 3. Исследование фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur в растительном материале (по оси абсцисс – год отбора образцов, по оси ординат – количество образцов)

В ходе исследований отечественного и импортного биоматериала выявлено 46 случаев заражения фитоплазмами некоторых видов растений, что составило 1,6%. Определена видовая принадлежность микроорганизмов:

– *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* из группы Apple proliferation, выявленных в растениях *Malus* spp. и *Pyrus* spp. импортного происхождения;

– *Candidatus Phytoplasma solani* из группы Stolbur обнаружен в *Vitis vinifera* L. из Республики Крым и в *Beta vulgaris* L. из Воронежской области;

– *Candidatus Phytoplasma convolvuli* и *Candidatus Phytoplasma asteris* в образцах *Convolvulus arvensis* L. и в *Barbarea vulgaris* W.T.Aiton из Тульской области.

#### Сравнительное исследование экстракции ДНК фитоплазм различными методами

Для выявления и идентификации сложных микроорганизмов, таких как фитоплазмы, очень важно использовать апробированные методы выделения ДНК.

В опыте осуществляли выделение ДНК микроорганизма *Ca. P. pyri* (группа Apple proliferation) из зараженного биоматериала разными реактивами: по методике Doyle & Doyle, наборами отечественных компаний ООО «Синтол» («ЦитоСорб/СytoSorb», «СОРБ-ГМО-Б», «ФитоСорб»), ООО «АгроДиагностика»

(«Проба-ГС», «Проба-НК») и зарубежной компании Qiagen («DNeasy Plant Mini Kit»). В экспериментах проводили сравнение выделения ДНК микроорганизма наборами реагентов отечественного и зарубежного производства с классической методикой Doyle & Doyle в 4-х кратной повторности для получения более точного результата.

Исследовали качество выделения ДНК микроорганизма *Ca. P. rugii* методом ПЦР в реальном времени с помощью набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma rugii*-РВ» (ООО «Синтол», Россия). В экспериментах определяли значение порогового цикла (Ct) после завершения амплификации, которое соответствует тому, чем больше находится количество целевой ДНК микроорганизма в образце, тем раньше наблюдается начало порогового цикла (табл. 2).

Результаты сравнения методов экстракции ДНК фитоплазмы свидетельствуют, что самая высокая концентрация ДНК микроорганизма *Ca. P. rugii* 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 – 27,4 Ct, но наблюдается ингибирование реакции ПЦР (40,5 Ct).

Полученные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что все используемые наборы реагентов могут быть использованы для выделения ДНК фитоплазм. Наиболее эффективными отечественными комплектами для экстракции ДНК фитоплазм являются «ЦитоСорб/CytoSorb» (29,1 Ct) и «Сорб-ГМО-Б» (31,6 Ct) компании ООО «Синтол». Данные наборы не уступают по техническим характеристикам по сравнению с классической и трудоемкой методикой Doyle & Doyle.

Таблица 2. Выделение ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma rugii* разными методами

Набор реагентов и пороговый цикл (Ct) по каналу FAM (специфика для <i>Candidatus Phytoplasma rugii</i> )				
Образец	Методика Doyle & Doyle	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	ЦитоСорб (Синтол)	Сорб-ГМО-Б (Синтол)
<i>Ca. P. rugii</i> (1)	26,9	26,9	28,6	31,9
<i>Ca. P. rugii</i> (2)	27,1	26,9	29,5	31,9
<i>Ca. P. rugii</i> (3)	27,2	27,9	28,5	31,5
<i>Ca. P. rugii</i> (4)	25,9	27,8	29,6	31,0
К-в (1)	N/A	N/A	N/A	N/A
К-в (2)	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
Ингибирование	-	+	-	-

К-в – отрицательный контрольный образец выделения; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср. з. – среднее значение; Ст. о. – стандартная ошибка.

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

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.

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.

Далее проводили определение оптимальной температуры отжига универсальных праймеров **fU5/rU3** для осуществления стабильной связи с ДНК-матрицей, которые применяют для видовой идентификации микроорганизмов методом секвенирования. Для этого осуществляли классическую амплификацию с использованием функции градиента температур от 47 до 57°C (с шагом в 2°C) на этапе отжига праймеров (рис. 4). В исследованиях использовали ДНК особо опасной фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* из группы *Apple proliferation*.

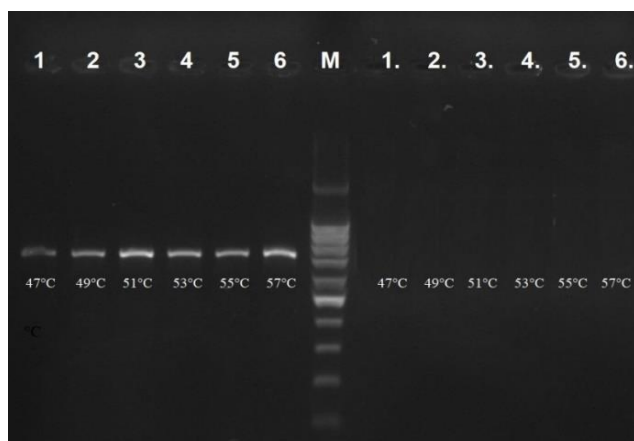


Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* с праймерами fU5/rU3 с функцией градиента температур: с 1 по 6 – ДНК; с 1. по 6. – отрицательный контрольный образец; М – маркер длины продукта ПЦР

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.

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

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 олигонуклеотидов **UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe** (Christensen et al., 2013), результаты амплификации представлены в таблице 3.

Таблица 3. Использование олигонуклеотидов  
UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe с использованием ДНК микроорганизмов

№ п/п	Образец	Специфичная реакция (ROX, Ct)	Внутренний положительный контроль (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 (H <sub>2</sub> O)	N/A	32,5
Ср. з. ± Ст. о.		22,6 ± 1,9	32,8 ± 0,1
Ct – номер цикла; N/A – отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. – среднее значение; Ст.о. – стандартная ошибка.			

Как видно из таблицы 3, используемые олигонуклеотиды UNI2-F/UNI2-R/UNI2-probe позволяют выявить разные виды фитоплазм, что показывает их универсальность. По каналу флуоресценции ROX получены средние значения для исследуемой группы Apple proliferation: для *Ca. P. mali* – 24,0 Ct, *Ca. P. pyri* – 20,6 Ct, *Ca. P. prunorum* – 27,4 Ct. Из исследуемой группы Stolbur получены результаты для вида *Ca. P. solani* – 26,4 Ct. Неспецифичные продукты реакции не зафиксированы с использованием ДНК растений-хозяев микроорганизмов и с фитопатогенными бактериями (N/A).

Полученные в ходе исследования результаты по изучению чувствительности, показывают, что выявление ДНК фитоплазм *Ca. P. mali* и *Ca. P. prunorum* осуществляется при разведении образца до 10<sup>-6</sup> (среднее значение 29,9 Ct и 34,0 Ct, соответственно); ДНК микроорганизмов *Ca. P. pyri* и *Ca. P. solani* – при разведении

образца до  $10^{-2}$  (среднее значение 30,7 Ct и 36,6 Ct). Ингибирование реакций отсутствовало по оценке внутреннего положительного контроля.

### 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.

На данном этапе работы проведено изучение аналитических характеристик универсальных праймеров **fU5/rU3**, разработанных на часть 16S рРНК. Данные праймеры использовали в качестве второго этапа вложенной ПЦР, после использования пары праймеров P1/P7 для первого этапа. Результаты по изучению аналитической специфичности с использованием ДНК фитопатогенных микроорганизмов и ДНК неинфицированных растений-хозяев представлены на рисунке 5.

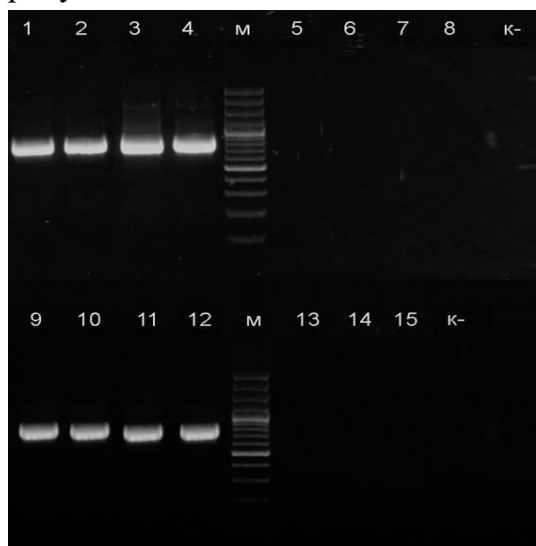


Рисунок 5. Электрофореграмма вложенной ПЦР с праймерами fU5/rU3: 1 – *Ca. P. mali*; 2 – *Ca. P. rugii*; 3 – *Ca. P. prunorum*; 4 – *Ca. P. solani*; 5 – *Malus domestica*; 6 – *Pyrus communis*; 7 – *Prunus armeniaca*; 8 – *Vitis vinifera*; 9 – *Ca. P. trifolii*; 10 – *Ca. P. asteris*; 11 – *Ca. P. convolvuli*; 12 – *Ca. P. rubi*; 13 – *E. amylovora*; 14 – *X. arboricola* pv. *pruni*; 15 – *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*; K- – отрицательный контроль ( $H_2O$ ); M – маркер длины продукта ПЦР

Результаты исследования показали отсутствие неспецифичных 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. Установлено, что реакция с ДНК микроорганизма *Ca. P. mali* стабильна при разведении образца в 10000 раз ( $10^{-4}$ ), далее продукт амплификации не получен. Прохождение реакции ПЦР с ДНК фитоплазмы *Ca. P. rugii* зафиксировано при разведении образца в 100 раз ( $10^{-2}$ ), единичные копии микроорганизма отмечены при разведении образца в 100000 раз ( $10^{-5}$ ). Выявление фитоплазм *Ca. P. prunorum* и *Ca. P. solani* с использованием пары праймеров fU5/rU3 осуществляется при разведении ДНК образца в 100 раз ( $10^{-2}$ ).



## Видовая идентификация фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur

Использование универсальных праймерных систем не позволяет быстро идентифицировать микроорганизм до вида, поэтому возникла необходимость использования видоспецифичных олигонуклеотидов для расширения возможности точной идентификации микроорганизмов за короткий период времени.

На следующем этапе исследования осуществляли идентификацию микроорганизма *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation с помощью видоспецифичных праймеров **ESFYf/ESFYr** (Yvon et al., 2009) (рис. 6).

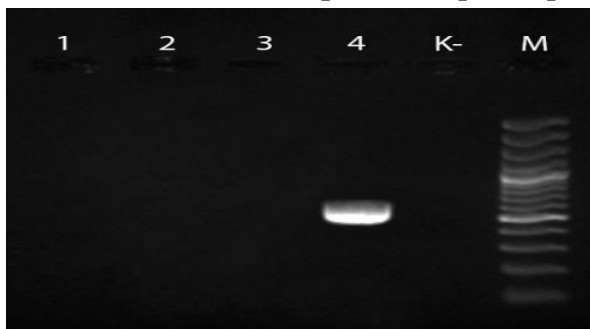


Рисунок 6. Электрофореграмма классической ПЦР с праймерами ESYf/ESFYr: 1 – *Ca. P. mali*; 2 – *Ca. P. rugii*; 3 – *Ca. P. prunorum*; 4 – *Ca. P. prunorum*; K- – отрицательный контроль (H<sub>2</sub>O); M – маркер длины продукта ПЦР

Установили, что праймеры ESYf/ESFYr позволяют выявить и идентифицировать только 7 нуклеотидных последовательностей ДНК-мишени – фитоплазмы *Ca. P. prunorum* из группы Apple proliferation. Следовательно, праймеры не селективны в отношении вида *Ca. P. prunorum*.

С целью оптимизации проведения ПЦР при изучении фитопатогенных микроорганизмов *Ca. P. mali*, *Ca. P. rugii* из группы Apple proliferation и *Ca. P. solani* из группы Stolbur в исследованиях проведена **апробация коммерческих тест-систем** отечественного производства компаний ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика».

Для определения аналитической чувствительности тест-систем компании ООО «Синтол» в работе была использована векторная конструкция на основе плазмиды pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия) с целевой вставкой фрагмента гена *aceF*, специфичной для фитоплазм *Ca. P. mali* и *Ca. P. rugii*, и фрагмента гена *seqY*, специфичной для фитоплазмы *Ca. P. solani*. Полученные результаты показывают высокую специфичность, выявление фитоплазмы *Ca. P. mali* осуществляется на 19,7 пороговом цикле (Ct), *Ca. P. rugii* – 21,2 Ct, *Ca. P. solani* – 18,6 Ct, и чувствительность (рис. 7) по отношению к изучаемым микроорганизмам.

Идентификация фитоплазм *Ca. P. mali* и *Ca. P. rugii* с помощью тест-систем компании ООО «АгроДиагностика» осуществляется на 17,7 Ct и *Ca. P. rugii* – 15,6 Ct, соответственно. При этом отмечается ее высокая чувствительность.

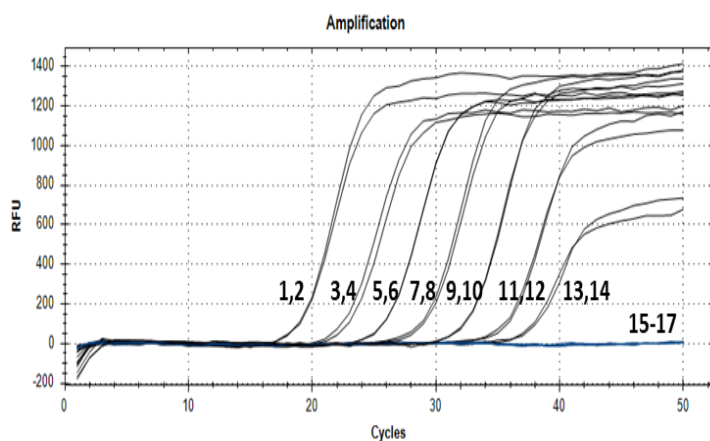


Рисунок 7. Чувствительность набора реагентов «*Candidatus Phytoplasma solani*-РВ» с использованием ДНК *Ca. P. solani* (серия разведений ДНК 1,2 – -3; 3,4 – -4; 5,6 – -5; 7,8 – -6; 9,10 – -7; 11,12 – -8; 13,14 – -9; 15,16 – -10; 17 – К-ч (H<sub>2</sub>O))

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

Методом секвенирования были идентифицированы все 46 образцов фитоплазм, выявленных в ходе исследований. На рисунке 8 показаны результаты множественного выравнивания исследуемых образцов биоматериала, зараженные *Candidatus Phytoplasma mali*, с последовательностями в базе данных NCBI в программе AliView (Швеция).

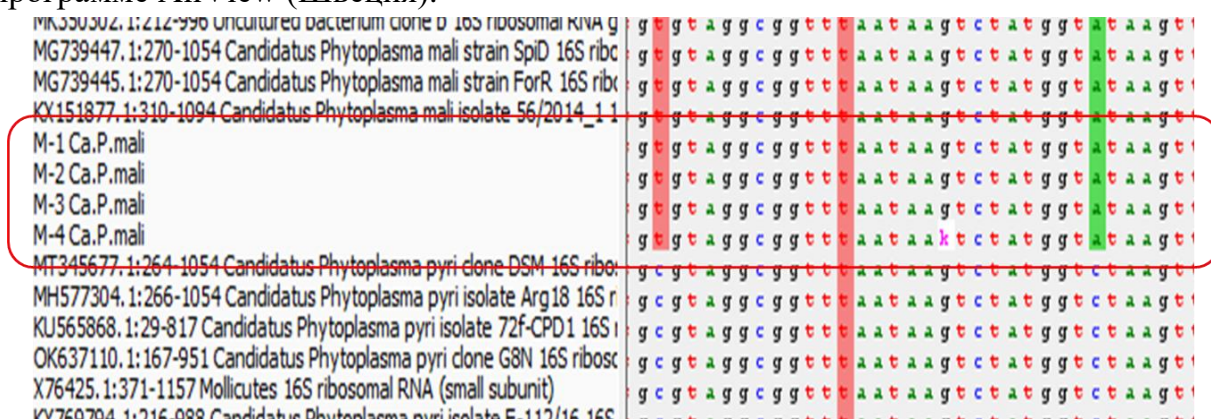


Рисунок 8. Фрагмент множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей *Ca. P. mali* с нуклеотидными последовательностями в NCBI на основании изучения фрагмента 16S рРНК гена

Из анализа 2939 образцов биоматериала установлено, что 1,6% растений были заражены фитоплазмами. Микроорганизмы *Candidatus Phytoplasma mali* и *Candidatus Phytoplasma pyri* выявлены в 0,1% от исследуемых образцов; в 1,2% фитоплазма *Candidatus Phytoplasma solani*; в 0,1% другие виды фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma convolvuli* и *Candidatus Phytoplasma asteris*.

В работе осуществлена расшифровка и анализ полученных нуклеотидных последовательностей фитоплазм из группы *Apple proliferation*. 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 (ID MG748693, MG748692, MG748694). Нуклеотидные последовательности также доступны Европейском нуклеотидном архиве ENA (ebi.ac.uk/ena) и Японском банке данных ДНК DNA Data Bank (ddbj.nig.ac.jp) для дальнейшего использования учеными научных учреждений, разработки методов видовой идентификации и других практических целей.

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. 9).

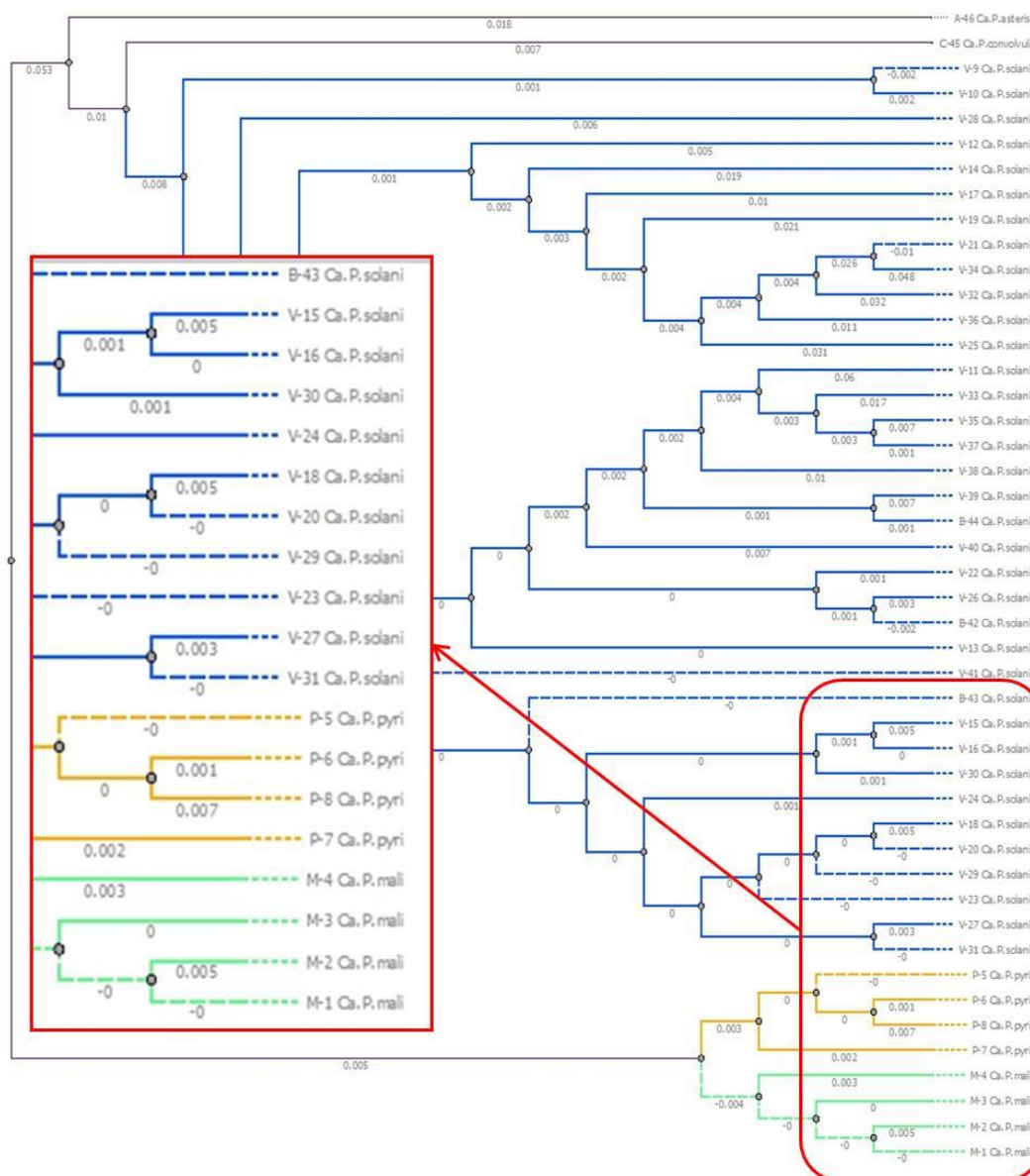


Рисунок 9. Филогенетическое дерево сходства фитоплазм *Ca. P. mali*, *Ca. P. pyri*, *Ca. P. solani*, *Ca. P. convolvuli* и *Ca. P. asteris*, идентифицированных в данной работе, по участку 16S рРНК гена

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

### **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.

### **Практические рекомендации**

1) Депонированы нуклеотидные последовательности микроорганизмов из группы Apple proliferation в Международную базу данных NCBI (ID MG748693, MG748692, MG748694), на основе изучения 16S-23S рРНК гена. Результаты доступны также в Европейском нуклеотидном архиве ENA и в Японском банке ДНК данных DNA Data Bank для дальнейшего использования учеными для разработки методов видовой идентификации и других практических целей.

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

3) Методические рекомендации по выявлению и идентификации фитоплазмы Европейской желтухи плодов косточковых *Candidatus Phytoplasma prunorum*.

## Используемые в автореферате сокращения

Ca. P. – *Candidatus Phytoplasma*

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВПК – внутренний положительный контроль

ВНИИКР – Всероссийский центр карантина растений

ВНИИФ – Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии

IVIA – Institut Valencia d'Investigacions Agraries (Испанский институт сельскохозяйственных исследований)

## Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Блинова С.А., Шварцев А.А., Сыксин С.В., Бондаренко Г.Н., **Башкирова И.Г.** и др. Разработка набора реагентов для диагностики фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* – возбудителя почернения древесины методом ПЦР в реальном времени // Сельскохозяйственная биология. 2020. Том 55(№ 1). С. 194-204.
2. **Bashkirova I.G.**, Bondarenko G.N., Kornev K.P. Study of methods for detecting quarantine phytoplasma's from the apple proliferation group on the territory of Russia // Phytopathogenic Mollicutes. June 2019. Vol. 9(1). P. 211-212.
3. Bondarenko G.N., **Bashkirova I.G.**, Aleynikova N.V., Radionovskaya Y.E. Monitoring of '*Candidatus Phytoplasma solani*' and "flavescence dorée" phytoplasma in south regions of the Russian Federation // Phytopathogenic Mollicutes. June 2019. Vol. 9(1). P. 209-210.
4. **Башкирова И.Г.**, Матяшова Г.Н., Гинс М.С. Выявление и идентификация возбудителей фитоплазмозов группы Apple proliferation на плодовых культурах // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. Вып. 3. С. 10-14.
5. **Башкирова И.Г.**, Матяшова Г.Н., Завриев С.К., Рязанцев Д.Ю., Шнейдер Ю.А. Апробация тест-систем для детекции фитоплазм яблони и груши // Защита и карантин растений. 2018. Вып. 7. С. 40-41.
6. Блинова С.А., Шварцев А.А., Сыксин С.В., Бондаренко Г.Н., **Башкирова И.Г.**, Гориславец С.М., Рисованная В.И., Странишевская Е.П., Володин В.А., Алексеев Я.И. Разработка набора реагентов для диагностики фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* методом ПЦР в реальном времени // IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. СПб.: ФГБНУ ВИЗР. 9-11 сентября 2019. С. 193.

7. **Bashkirova I.G.**, Bondarenko G.N., Gins M.S. Real-Time PCR to identify phytoplasmas from the Apple proliferation group // 1st International Molecular Plant Protection Congress "Molecular Approaches for Better Plant Protection". Adana, Turkey, 2019. P. 93.
8. **Башкирова И.Г.**, Бондаренко Г.Н., Смирнова И.П. Видовая идентификация *Candidatus Phytoplasma prunorum* // Сборник тезисов: Биология – наука XXI века: 24-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино. 2020. С. 396.
9. **Башкирова И.Г.**, Шварцев А.А. Видовая диагностика возбудителей фитоплазмозов и фузариозов на западноевропейских сортах винограда // Защита растений от вредных организмов: материалы 10-й междунар. науч.-практ. конф., Краснодар, 2021. С. 37-39.
10. **Башкирова И.Г.**, Шварцев А.А., Смирнова И.П. Исследование распространения возбудителей фитоплазмозов и фузариозов в некоторых районах Московской области // Агробиотехнология-2021: матер. Междунар. науч. конф. Москва: РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева. 2021. С. 460-465.
11. **Bashkirova I.G.**, Bondarenko G.N., Shvartsev A.A., Alexeev Ya.I., Blinova S.A. Development of reagent kits for the identification of *Candidatus Phytoplasma mali* and *Candidatus Phytoplasma pyri* using Real-time PCR // 16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Limassol, Cyprus, 2022. P. 233.

**Башкирова Ида Геннадьевна (Российская Федерация)**  
**Изучение фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur с помощью  
молекулярно-генетических методов диагностики**

Проведено исследование по распространению особо опасных фитоплазм из групп Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) и Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*) в некоторых регионах Российской Федерации и зарубежных стран. Осуществлено сравнительное изучение и апробация методов экстракции ДНК фитоплазм из зараженного растительного материала с помощью отечественных реагентов. Впервые подобраны оптимальные реакционные смеси для проведения ПЦР при диагностике фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur. Для видовой идентификации микроорганизмов из групп Apple proliferation и Stolbur успешно изучены и апробированы возможности использования тест-систем отечественного производства. Осуществлена видовая идентификация полученных нуклеотидных последовательностей фитоплазм из групп Apple proliferation и Stolbur на основе изучения участков 16S-23S рРНК гена, которые депонированы в Международную базу данных NCBI.

**Bashkirova Ida G (Russian Federation)**  
**The study of the Apple proliferation and Stolbur groups phytoplasmas using  
molecular genetic diagnostic methods**

The study was carried out on the distribution of especially dangerous phytoplasmas from the Apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*) and Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*) groups in some regions of the Russian Federation and foreign countries. A comparative study and testing of methods extraction DNA of phytoplasmas was carried from infected plant material using Russian reagents. For the first time were selected the optimal PCR reaction mixtures for the detection phytoplasmas from the Apple proliferation and Stolbur groups. Successfully studied and tested Russian test systems for the species identification of microorganisms from the Apple proliferation and Stolbur groups. In this work, the species identification of the nucleotide sequences of phytoplasmas from the Apple proliferation and Stolbur groups was carried out based on the study of the 16S-23S rRNA gene regions. The nucleotide sequences were deposited in the Database NCBI.