

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 634.11:632  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-88-97>

Поступила в редакцию 15.04.2020  
Received 15.04.2020

**Т. Н. Божидай, Е. В. Колбанова, Н. В. Кухарчик**

*Институт плодоводства, а/г Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь*

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ ФИТОПЛАЗМЫ ЯБЛОНИ

**Аннотация.** Для выявления фитоплазмы яблони в осенний период наиболее подходящими образцами для диагностических исследований являются корни, а при наличии ярко выраженных характерных симптомов («ведьмины метлы») можно использовать симптоматичные побеги.

Методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P и гнездовой ПЦР с праймерами P1/Tint и fO1/rO1 позволяют диагностировать *Candidatus Phytoplasma mali* с высокой степенью чувствительности и воспроизводимости.

Сравнение нуклеотидных последовательностей белорусских изолятов с последовательностями, представленными в EMBL/GenBank, показало, что все белорусские изоляты фитоплазмы, выявленные на растениях яблони сортов Алеся, Сябрына, Память Сикоры, относятся к виду *Candidatus Phytoplasma mali*. Нуклеотидные последовательности помещены в международную базу данных (EMBL/GenBank) с присвоением идентификационных номеров (LR701160, LR701188, LR701436, LR701155, LR701438, LR701439, LR701440). Идентичность нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена белорусских образцов *Ca. P. mali* варьировалась от 99,7 до 100,0 %, участка *hflB* гена – от 99,6 до 100,0 %.

**Ключевые слова:** яблоня, фитоплазма, ДНК, ПЦР, филогенетический анализ, Беларусь

**Для цитирования:** Божидай, Т. Н. Идентификация и молекулярная характеристика белорусских изолятов фитоплазмы яблони / Т. Н. Божидай, Е. В. Колбанова, Н. В. Кухарчик // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 88–97. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-88-97>

**Tatsiana N. Bazhydai, Elena V. Kolbanova, Natallia V. Kukharchyk**

*Institute for Fruit Growing, a/c Samokhvalovichy, Minsk Region, Republic of Belarus*

## THE IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF BELARUSIAN APPLE PROLIFERATION PHYTOPLASMA ISOLATES

**Abstract.** It is known that optimal source of samples for diagnostic of apple proliferation phytoplasma in autumn is roots. In case of the occurrence of pronounced characteristic symptoms – “witches’ broom”, can be used symptomatic shoots.

Real-time PCR with primer pair Phyto-F/Phyto-R and probe Phyto-P and nested PCR with primer pair P1/Tint and fO1/rO1 can be used to detect *Candidatus Phytoplasma mali* with a high degree of sensitivity and reproducibility.

Comparison of the nucleotide sequences of Belarusian isolates with the sequences presented in EMBL/GenBank showed that all Belarusian phytoplasma isolates detected on apple cultivars Alesya, Syabryna, Pamyat Sikory belong to species *Candidatus Phytoplasma mali*. The nucleotide sequences are placed in international database (EMBL/GenBank) with identification numbers (LR701160, LR701188, LR701436, LR701155, LR701438, LR701439, LR701440). The identity of the nucleotide sequences of region of 16S rRNA gene of Belarusian samples of *Ca. P. mali* ranged from 99.7 to 100.0 %, and *hflB* gene region ranged from 99.6 to 100.0 %.

**Keywords:** apple, phytoplasma, DNA, PCR, phylogenetic analysis, Belarus

**For citation:** Bazhydai T. N., Kolbanova E. V., Kukharchyk N. V. The identification and molecular characteristics of Belarusian apple proliferation phytoplasma isolates. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 88–97 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-88-97>

**Введение.** Пролиферация яблони (возбудитель *Candidatus Phytoplasma mali*) является одним из экономически значимых заболеваний, приводящих к значительным потерям урожая и последующей гибели деревьев. *Ca. P. mali* относится к группе 16SrX (подгруппа А) [1, 2] и внесена Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений в список А2 вредных организмов [3]. Ее присутствие не допускается при производстве сертифицированного посадочного материала, а зараженные образцы подлежат контролю.

Наиболее характерными симптомами поражения *Ca. P. mali* являются ветвящиеся в верхней трети тонкие побеги – «ведьмины метлы». Листья образуются мелкие, сильно зубчатые, с большими прилистниками и короткими черешками [3].

В результате накопления во флоэме фитоплазмы происходит отмирание отдельных тканей флоэмы. Такие изменения ослабляют устойчивость растений к комплексу экстремальных факторов среды абиотической, биотической и антропогенной природы, что приводит к гибели растений. Наиболее яркие признаки фитоплазмозов древесных растений проявляются в начальные периоды жизни дерева, а также на старовозрастных деревьях [4].

Фитоплазменная инфекция часто приводит к гибели растений и наносит огромный ущерб сельскохозяйственному производству. Так, в 2001 г. вспышка фитоплазменных заболеваний в насаждениях яблони причинила убытки на сумму около 100 млн евро в Италии и на 25 млн евро в Германии [5].

Привлечение современных методов диагностики позволяет установить фитосанитарный статус растений в насаждениях, своевременно выбраковать больные растения и выделить незараженные растения для создания маточно-черенковой базы [6, 7]. Основным методом выявления фитоплазмы является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Надежность ПЦР-анализа определяется концентрацией фитоплазмы в растении-хозяине, которая в свою очередь может варьироваться в зависимости от штамма или вида фитоплазмы, вида растения-хозяина, периода развития инфекции и погодных условий [8–11].

Достоверным методом определения вида фитоплазмы является секвенирование участков генома и их последующее сравнение с фитоплазмами из EMBL/GenBank, относящимися к разным видам.

Знание о локализации консервативных и варибельных областей внутри генома является важным для диагностики и разработки современных методов контроля патогена.

Цель работы – оценить наличие патогена *Candidatus Phytoplasma mali* в различных тканях яблони в осенний период и эффективность различных видов полимеразной цепной реакции для диагностики фитоплазмы, установить нуклеотидную последовательность фрагмента 16S rRNA и *hflB* генов белорусских изолятов фитоплазмы яблони.

**Методика и материалы исследования.** Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2019–2020 гг. Материалом для исследования служили деревья сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) Память Сикоры и Алеся (подвой 54-118, год посадки – 2006), Сябрына (подвой ПБ-4, год посадки – 2009).

С целью оптимизации отбора проб для тестирования яблони в осенний период на наличие фитоплазмы оценивали присутствие патогена в различных тканях растения-хозяина (деревья яблони сорта Память Сикоры) с визуальными симптомами фитоплазмы («ведьмины метлы»): корнях (проводящие ткани), побегах (проводящие ткани) и листьях.

ДНК выделяли с помощью коммерческого набора реактивов Genomic DNA Purification Kit (Termo Scientific, Литва). Концентрацию ДНК в полученном растворе измеряли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Implen, Германия).

Для диагностики фитоплазмы использовали ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P, гнездовую ПЦР с праймерами P1/Tint и fO1/rO1, P1/P7 и R16F2n/R16R2 и классическую ПЦР с праймерами fhflB3\_1/rhflB3 (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Праймеры, использованные для диагностики изолятов фитоплазмы яблони

Table 1. Primers used to detect apple phytoplasma isolates

Метод диагностики	Праймер	Последовательность (5'-3')	Источник
ПЦР в реальном времени	Phyto-F	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA	[12]
	Phyto-R	TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA	
	Phyto-P	FAM-TGACGGGACTCCGCACAAGCG-BHQ-1	
Гнездовая ПЦР	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	[13]
	Tint	TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC	
	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	

Окончание табл. 1

Метод диагностики	Праймер	Последовательность (5'-3')	Источник
	Tint	TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC	[14]
	fO1	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT	
	rO1	AAGTGCCCAACTAAATGAT	
	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	[15, 16]
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	[17, 18]
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAACCCCG		
Классическая ПЦР	fhfB3_1	TTCTAGCTATTCATCGTGAA	[19]
	rhfB3	CGGCGGATTAGTAGCTCC	

Аmplификацию проводили с использованием для ПЦР в реальном времени ArtStart ДНК-полимеразу («АртБиоТех», Беларусь), для классической и гнездовой ПЦР – Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Литва) и амплификатор C1000 Touch-CFX96 (Bio-Rad, США).

*Температурный режим проведения гнездовой ПЦР для разных пар праймеров:*

1) начальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °C в течение 30 с, при 55 °C в течение 30 с и при 72 °C в течение 2 мин (для праймеров P1/tint) и 1,5 мин (для праймеров fO1/rO1); при 72 °C в течение 5 мин;

2) начальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °C в течение 30 с, при 50 °C в течение 30 с (для праймеров P1/P7) и при 55 °C в течение 30 с (для праймеров R16F2n/R16R2) и при 72 °C в течение 2 мин; при 72 °C в течение 5 мин.

В качестве ДНК-матрицы для второго этапа гнездовой ПЦР использовали продукт ПЦР первого этапа в разведении 1:30.

*Температурный режим проведения классической ПЦР:* начальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °C в течение 30 с, при 50 °C в течение 30 с и при 72 °C в течение 1 мин; при 72 °C в течение 5 мин.

Продукты амплификации после классической и гнездовой ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле. Результаты электрофореза документировали с помощью аппаратного обеспечения Gel Doc System (Bio-Rad, США).

*Температурный режим проведения ПЦР в реальном времени:* начальная денатурация при 95 °C в течение 2 мин; 45 циклов при 95 °C в течение 5 с, при 60 °C в течение 30 с и при 67 °C в течение 15 мин.

Аmplифицированные фрагменты 16S rRNA гена 3 белорусских изолятов и *hfb* гена 7 белорусских изолятов были секвенированы на генетическом анализаторе AB 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси».

Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программный пакет MEGA 6.0. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли при помощи Clustal W алгоритма. Филогенетические деревья были построены с помощью программы MEGA 6.0 методом Neighbour-Joining. Цифрами обозначены достоверности (в процентах) расхождения ветвей, выявленные с помощью бутстреп (bootstrap) анализа (1000 псевдореплик), который позволяет оценить статистическую надежность каждого из узлов построенного дерева. В случае бутстреп-поддержки ниже 70 % статистическая надежность данного узла считалась недостоверной. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее пяти заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

**Результаты и их обсуждение.** Для тестирования на наличие фитоплазмы в насаждениях яблони были взяты образцы (корни) в осенний период с 8 деревьев сорта Память Сикоры, имеющие визуальные симптомы фитоплазмы – «ведьмины метлы» (пролиферация пазушных побегов) (рис. 1). Молекулярные исследования подтвердили наличие фитоплазмы у этих 8 деревьев яблони. С помощью методов ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P, гнездовой ПЦР с праймерами P1/Tint и fO1/rO1, P1/P7 и R16F2n/R16R2 установлено 100 %-ное заражение образцов, в то время как классическая ПЦР с праймерами fhfB3\_1/rhfB3 показала 87,5 % (7 положительных образцов из 8) (табл. 2).



Рис. 1. Побеги яблони сорта Память Сикоры с симптомами поражения фитоплазмой

Fig. 1. Shoots of apple tree (cv. Pamyat Sikory) with symptoms of phytoplasma infection

Т а б л и ц а 2. Результаты тестирования яблони с визуальными симптомами на наличие фитоплазмы при использовании различных видов ПЦР (тип образца – корни)

T a b l e 2. Results of testing of apple trees with visual symptoms for the presence of phytoplasma using various types of PCR (sample type – roots)

№ образца	Визуальные симптомы	ПЦР в реальном времени	Гнездовая ПЦР				Классическая ПЦР
		Праймеры					
		Phyto-F/Phyto-R/Phyto-P	P1/Tint	fO1/rO1	P1/P7	R16F2n/R16R2	fhflB3_1/rhflB3
2к	+	+	–	+	–	+	+
6к	+	+	–	+	–	+	+
7к	+	+	–	+	–	+	+
19к	+	+	+	+	–	+	+
21к	+	+	–	+	–	+	+
23к	+	+	–	+	–	+	+
24к	+	+	–	+	–	+	+
25к	+	+	–	+	–	+	–

У 4 деревьев яблони сорта Память Сикоры, имеющих визуальные симптомы фитоплазмы – «ведьмины метлы», кроме проводящих тканей корней для анализа различными видами ПЦР были взяты еще два типа образцов с наземной части растения – побеги (проводящие ткани) и листья. При проведении ПЦР в реальном времени и гнездовой ПЦР с праймерами P1/Tint и fO1/rO1 использование в качестве образцов листьев дает положительный результат в 3 случаях из 4 (75 %), при проведении гнездовой ПЦР с праймерами P1/P7 и R16F2n/R16R2 и классической ПЦР с праймерами fhflB3\_1/rhflB3 положительный результат был получен в 2 случаях из 4 (50 %). Использование в качестве образцов проводящих тканей побега не дало ложноотрицательных результатов при использовании ПЦР в реальном времени, гнездовой и классической ПЦР (табл. 3).

У 9 визуально здоровых деревьев яблони сорта Память Сикоры заражение фитоплазмой было выявлено у 2 деревьев методами ПЦР в реальном времени, гнездовой и классической ПЦР, в качестве образцов брали проводящие ткани корней (табл. 4).

Т а б л и ц а 3. Результаты тестирования яблони с визуальными симптомами на наличие фитоплазмы при использовании разных типов образцов и видов ПЦР

T a b l e 3. Results of testing of apple trees with visual symptoms for the presence of phytoplasma using different types of samples and types of PCR

№ образца	Визуальные симптомы	ПЦР в реальном времени	Гнездовая ПЦР				Классическая ПЦР
		Праймеры					
		Phyto-F/Phyto-R/Phyto-P	P1/Tint	fO1/rO1	P1/P7	R16F2n/R16R2	fhflB3_1/rhflB3
6к	+	+	–	+	–	+	+
6п	+	+	+	+	+	+	+
6л	+	+	+	+	–	+	+
7к	+	+	–	+	–	+	+
7п	+	+	–	+	–	+	+
7л	+	+	–	+	–	–	+
19к	+	+	+	+	–	+	+
19п	+	+	+	+	–	+	+
19л	+	+	–	+	–	+	–
25к	+	+	–	+	–	+	–
25п	+	+	–	+	–	+	+
25л	+	–	–	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е. Исследуемые образцы: к – корни, п – побеги, л – листья.

Т а б л и ц а 4. Результаты тестирования визуально здоровой яблони на наличие фитоплазмы при использовании различных видов ПЦР (тип образца – корни)

T a b l e 4. Results of testing of visually healthy apple for the presence of phytoplasma when using various types of PCR (sample type – roots)

№ образца	Визуальные симптомы	ПЦР в реальном времени	Гнездовая ПЦР				Классическая ПЦР
		Праймеры					
		Phyto-F/Phyto-R/Phyto-P	P1/Tint	fO1/rO1	P1/P7	R16F2n/R16R2	fhflB3_1/rhflB3
9к	–	–	–	–	–	–	–
11к	–	–	–	–	–	–	–
12к	–	+	–	+	–	+	+
13к	–	+	–	+	–	+	+
14к	–	–	–	–	–	–	–
16к	–	–	–	–	–	–	–
17к	–	–	–	–	–	–	–
18к	–	–	–	–	–	–	–
20к	–	–	–	–	–	–	–

Таким образом, для выявления фитоплазмы яблони в осенний период наиболее подходящими образцами для диагностических исследований являются корни, а при наличии побегов с ярко выраженными симптомами («ведьмины метлы») можно использовать симптоматичные побеги. Методы ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P и гнездовой ПЦР с праймерами P1/Tint и fO1/rO1 позволяют диагностировать фитоплазму яблони с высокой степенью чувствительности и воспроизводимости. Преимуществами ПЦР в реальном времени являются высокая пропускная способность тестирования, так как не требуются дополнительные методы (электрофорез) для получения результата и меньше риск перекрестной контаминации, чем при классической и гнездовой ПЦР.

По данным M. Garcia-Чара с соавт. [10], при диагностике фитоплазмы истощения и отмирания груши (Pear decline phytoplasma) методом гнездовой ПЦР с использованием праймеров P1/P7 и fO1/rO1 из трех изученных образцов (жилки листьев, почки и стебли) лучшими являлись стебли, а период тестирования, позволяющий максимально выявить зараженные деревья, – зимние месяцы. По данным U. Schaper, E. Seemüller [20], у деревьев яблони и груши возбудитель фитоплазмы зимует преимущественно в корнях, а весной снова распространяется в наземную часть

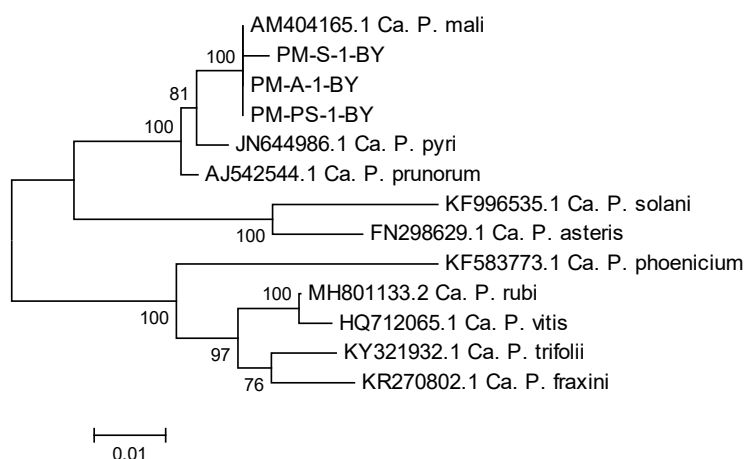


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей участка 16S rRNA гена изолятов различных видов *Candidatus Phytoplasma*

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed using the Neighbor-Joining algorithm on the basis of the comparison of nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragment of isolates of various species of *Candidatus Phytoplasma*

растения, однако у больных деревьев отмечена возможность зимовки фитоплазмы в наземных частях растения в ситовидных трубках, появившихся в конце сезона в качестве замещающей флоэмы. Фитоплазма была успешно диагностирована методом ПЦР с праймерами P1/P7 в черешках и жилках листьев яблони, груши, вишни, персика, винограда, а также в корнях и спящей древесине груши, вишни и персика [21]. Методом гнездовой ПЦР с праймерами R16mF2/R16mR1 и R16F2n/R16R2 фитоплазма была выявлена в спящих почках в зимний период у деревьев яблони, вишни, персика, сливы, в то время как использование тканей междоузлий побегов дало положительный результат только у вишни и персика [22].

В результате молекулярно-генетических исследований были получены данные о нуклеотидных последовательностях участков 16S rRNA и *hflB* генов белорусских изолятов.

Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента 16S rRNA гена 3 изолятов (PM-A-1-BY, PM-S-1-BY, PM-PS-1-BY) сравнивали с последовательностями, кодирующими ту же область следующих видов фитоплазм, представленных в базе данных EMBL/GenBank: *Ca. P. rubi* (MH801133.2), *Ca. P. vitis* (HQ712065.1), *Ca. P. trifolii* (KY321932.1), *Ca. P. fraxini* (KR270802.1), *Ca. P. phoenicium* (KF583773.1), *Ca. P. asteris* (FN298629.1), *Ca. P. prunorum* (AJ542544.1), *Ca. P. mali* (AM404165.1), *Ca. P. pyri* (JN644986.1), *Ca. P. solani* (KF996535.1) (рис. 2).

Сравнение нуклеотидных последовательностей выделенных белорусских изолятов с последовательностями, представленными в международной базе данных EMBL/GenBank, показало, что все белорусские изоляты фитоплазмы, выделенные из яблони сортов Алеся, Сябрына, Память Сикоры, относятся к виду *Ca. P. mali*.

Следует отметить, что идентичность последовательностей участков гена *Ca. P. mali* с изолятами, приведенными в базе данных EMBL/GenBank, варьировалась от 93,5 до 100,0 %.

Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в международной базе данных (EMBL/GenBank) с присвоением идентификационных номеров (табл. 5).

Идентичность нуклеотидных последовательностей участка 16S rRNA гена белорусских образцов *Ca. P. mali* варьировалась от 99,7 до 100,0 %, участка *hflB* гена – от 99,6 до 100,0 %.

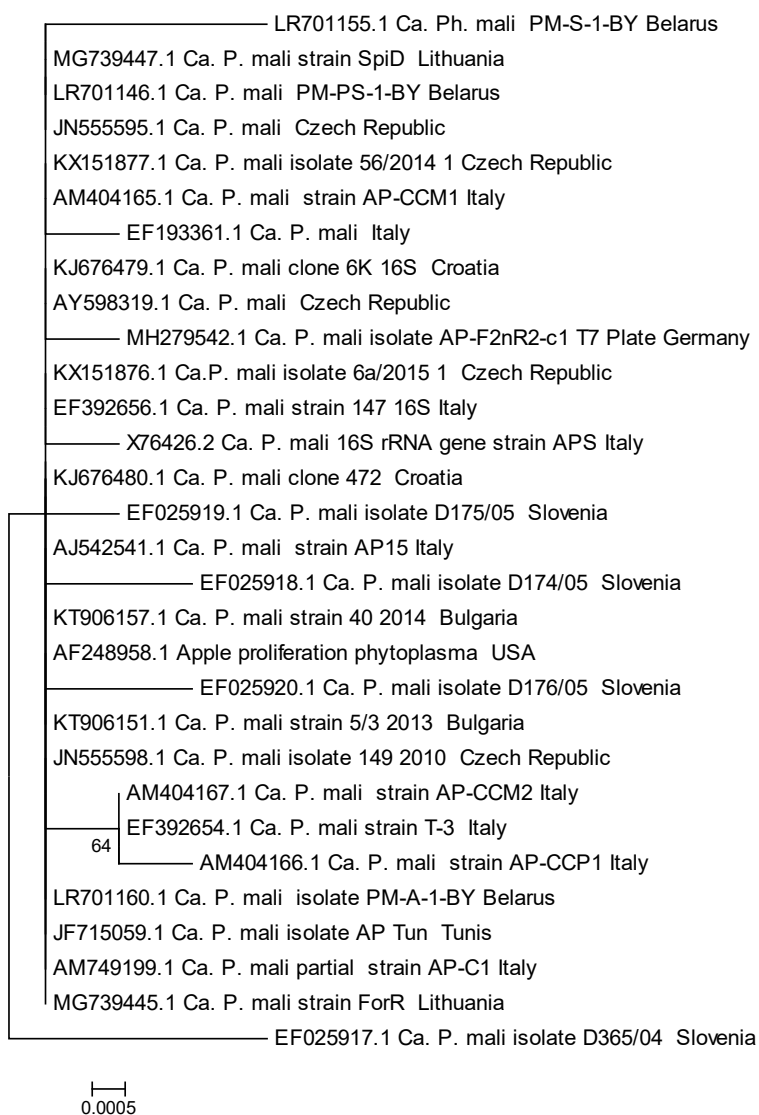
Филогенетическое древо, представленное на рис. 3, отражает степень генетического сходства изолятов *Ca. P. mali*. Кластерный анализ изучаемых и ранее опубликованных нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена изолятов *Ca. P. mali* показал, что последовательности были близкородственны, корреляции между группированием изолятов и их географическим происхождением не обнаружено (рис. 3).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента *hflB* гена показал, что белорусские изоляты находятся в одном кластере (рис. 4).

Таблица 5. Выделенные из растений яблони белорусские изоляты фитоплазмы, депонированные в международной базе данных (EMBL/GenBank)

Table 5. Belarusian phytoplasma isolates from apple plants deposited in the international database (EMBL/GenBank)

Сорт	Подвой	Год посадки	Название изолята	Участок генома	№ нуклеотидной последовательности (GenBank)
Алеся	54-118	2006	PM-A-1-BY	16S rRNA	LR701160
			PM-A-2-BY	hflB	LR701188
			PM-A-3-BY	hflB	LR701436
Сябрына	ПБ-4	2009	PM-S-1-BY	16S rRNA	LR701155
			PM-S-2-BY	hflB	LR701438
			PM-S-3-BY	hflB	LR701439
Память Сикоры	54-118	2006	PM-PS-1-BY	16S rRNA	LR701146
			PM-PS-2-BY	hflB	LR701437
			PM-PS-3-BY	hflB	LR701441
			PM-PS-4-BY	hflB	LR701440

Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена для штаммов *Ca. P. mali*Fig. 3. Phylogenetic tree constructed using Neighbor-Joining algorithm on the basis of the comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragment for strains of *Ca. P. mali*

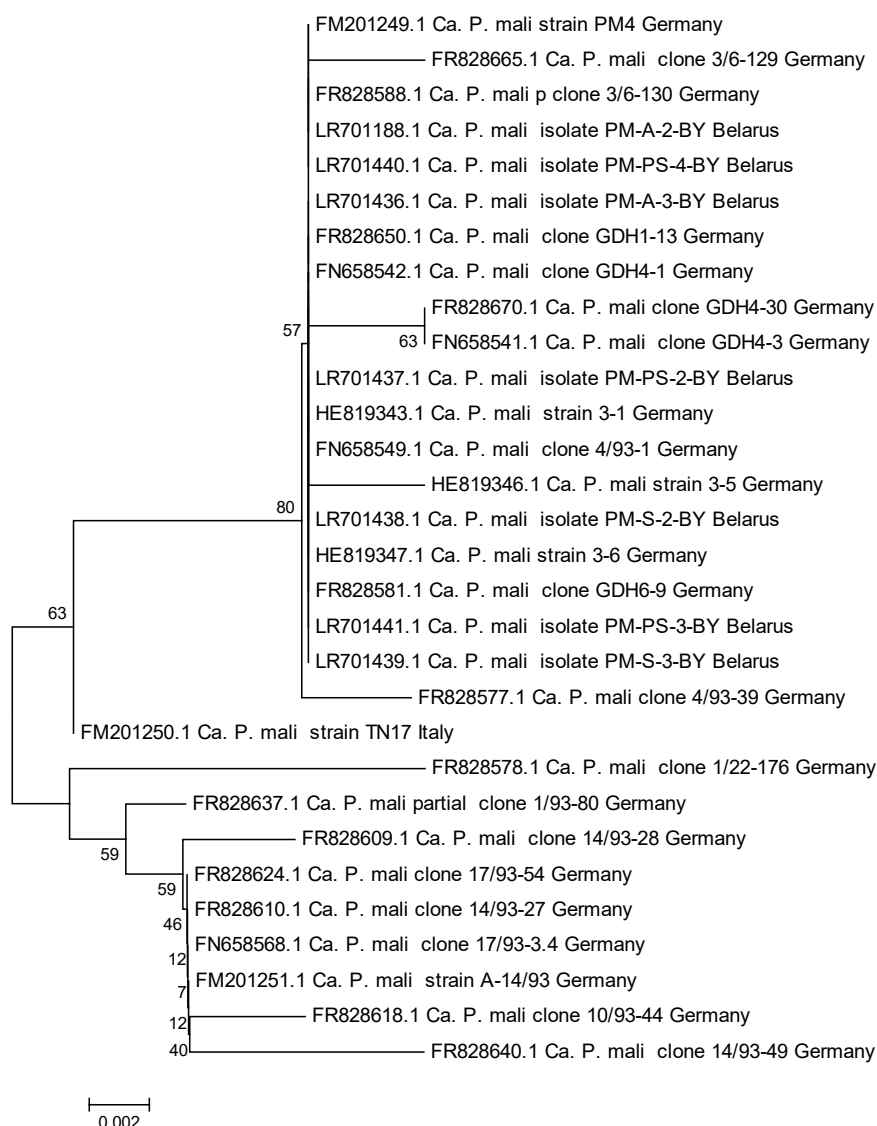


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента *hflB* гена для штаммов *Ca. P. mali*

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed using the Neighbor-Joining algorithm on the basis of the comparison of the nucleotide sequences of *hflB* gene fragment for strains of *Ca. P. mali*

Так как данные о нуклеотидных последовательностях фрагмента *hflB* гена *Ca. P. mali* в настоящее время представлены В. Schneider и Е. Seemuller [19] в базе данных EMBL/GenBank в основном только из Германии, нельзя однозначно утверждать, что имеется зависимость между группированием изолятов и их географическим происхождением.

**Заключение.** Для выявления фитоплазмы яблони в осенний период наиболее подходящими образцами для диагностических исследований являются корни, а при наличии ярко выраженных характерных симптомов на побегах («ведьмины метлы») можно использовать симптоматичные побеги.

Методы ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P и гнездовой ПЦР с праймерами P1/Tint и fO1/rO1 позволяют диагностировать *Candidatus Phytoplasma mali* с высокой степенью чувствительности и воспроизводимости.

Сравнение нуклеотидных последовательностей выделенных белорусских изолятов с последовательностями, представленными в международной базе данных EMBL/GenBank, показало, что все белорусские изоляты фитоплазмы, выявленные на растениях яблони сортов Алеся, Сябрына, Память Сикоры, относятся к виду *Ca. P. mali*. Нуклеотидные последовательности помеще-



ны в международную базу данных (EMBL/GenBank) с присвоением идентификационных номеров (LR701160, LR701188, LR701436, LR701155, LR701438, LR701439, LR701146, LR701437, LR701441, LR701440). Идентичность нуклеотидных последовательностей участка 16S rRNA гена белорусских образцов *Ca. P. mali* варьировалась от 99,7 до 100,0 %, участка *hflB* гена – от 99,6 до 100,0 %.

### Список использованных источников

1. Seemuller, 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. Seemuller, B. Schneider // Int. J. System. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54. – P. 1217–1226. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02823-0>
2. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences / I.-M. Lee [et al.] // Int. J. System. Bacteriol. – 1998. – Vol. 48, N 4. – P. 1153–1169. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1153>
3. PM 7/62 (2) ‘*Candidatus phytoplasmas mali*’, ‘*Ca. P. pyri*’ and ‘*Ca. P. prunorum*’ // EPPO Bull. – 2017. – Vol. 47, N 2. – P. 146–163. <https://doi.org/10.1111/epp.12380>
4. Maejima, K. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria / K. Maejima, K. Oshima, Sh. Namba // J. Gen. Plant Pathol. – 2014. – Vol. 80, N 3. – P. 210–221. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0512-8>
5. Eben, A. Innovative vector control [Electronic resource] / A. Eben, J. Gross // New perspectives in phytoplasma disease management / COST action FA0807 Workshop. – Barcelona, Spain, 2013. – P. 38–40. – Mode of access : <http://costphytoplasma.ipwgn.net/PDF%20files/BOOK%20COST%20BCN%202013%20080313web.pdf>. – Date of access : 02.03.2019.
6. Bertaccini, A. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research / A. Bertaccini, B. Duduk // Phytopathologia Mediterranea. – 2009. – Vol. 48, N 3. – P. 355–378.
7. Marzachi, C. Molecular diagnosis of phytoplasmas / C. Marzachi // Arab J. Plant Protection. – 2006. – Vol. 24, N 2. – P. 139–142.
8. Berges, R. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction / R. Berges, M. Rott, E. Seemüller // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90, N 10. – P. 1145–1152. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.10.1145>
9. Constable, F. E. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines / F. E. Constable, K. S. Gibb, R. H. Symons // Plant Pathol. – 2003. – Vol. 52, N 3. – P. 267–276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00849.x>
10. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars / M. Garcia-Chapa [et al.] // Plant Pathol. – 2003. – Vol. 52, N 4. – P. 513–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00868.x>
11. Spatiotemporal distribution of flavescence doree phytoplasma in grapevine / N. Prezelj [et al.] // Plant Pathol. – 2012. – Vol. 62, N 4. – P. 760–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x>
12. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging / N. M. Christensen [et al.] // Molecular Plant – Microbe Interactions. – 2004. – Vol. 17, N 11. – P. 1175–1184. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1175>
13. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region / C. D. Smart [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62, N 8. – P. 2988–2993. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2988-2993.1996>
14. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA / K. H. Lorenz [et al.] // Phytopathology. – 1995. – Vol. 85. – P. 771–776. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-771>
15. Deng, S. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes / S. Deng, C. Hiruki // J. Microbiol. Meth. – 1991. – Vol. 14, N 1. – P. 53–61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
16. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology / ed. : S. Razin, J. G. Tully. – San Diego : Academic Press, 1995. – 483 p.
17. Gundersen, D. E. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs / D. E. Gundersen, I.-M. Lee // Phytopathologia Mediterranea. – 1996. – Vol. 35, N 3. – P. 144–151.
18. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy / I. M. Lee [et al.] // Phytopathology. – 1995. – Vol. 85. – P. 728–735. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-728>
19. Schneider, B. Strain differentiation of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ by SSCP and sequence analyses of the *hflB* gene / B. Schneider, E. Seemuller // J. Plant Pathol. – 2009. – Vol. 91, N 1. – P. 103–112.
20. Schaper, U. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline / U. Schaper, E. Seemüller // Phytopathology. – 1982. – Vol. 72. – P. 736–742. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-736>
21. Green, M. J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction / M. J. Green, D. A. Thompson, D. J. MacKenzie // Plant Disease. – 1999. – Vol. 83, N 5. – P. 482–485. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.482>
22. Waterworth, H. E. An Assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm / H. E. Waterworth, R. Mock // Plant Dis. – 1999. – Vol. 83, N 11. – P. 1047–1050. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.11.1047>

### References

1. Seemuller E., Schneider B. ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, vol. 54, pp. 1217–1226. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02823-0>

2. Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bartoszyk I. M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, vol. 48, no. 4, pp. 1153–1169. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1153>
3. PM 7/62 (2) ‘*Candidatus phytoplasmas mali*’, ‘*Ca. P. pyri*’ and ‘*Ca. P. prunorum*’. *EPPO Bulletin*, 2017, vol. 47, no. 2, pp. 146–163. <https://doi.org/10.1111/epp.12380>
4. Maejima K., Oshima K., Namba Sh. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, vol. 80, no. 3, pp. 210–221. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0512-8>
5. Eben A., Gross J. *Innovative vector control*. New perspectives in phytoplasma disease management. COST action FA0807 Workshop. Barcelona, Spain, 2013, pp. 38–40. Available at: <http://costphytoplasma.ipwgn.net/PDF%20files/BOOK%20COST%20BCN%202013%20080313web.pdf> (accessed 02.03.2019).
6. Bertaccini A., Duduk B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 2009, vol. 48, no. 3, pp. 355–378.
7. Marzachi C. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Arab Journal of Plant Protection*, 2006, vol. 24, no. 2, pp. 139–142.
8. Berges R., Rott M., Seemüller E. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 2000, vol. 90, pp. 1145–1152. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1145>
9. Constable F. E., Gibb K. S., Symons R. H. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 2003, vol. 52, no. 3, pp. 267–276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00849.x>
10. Garcia-Chapa M., Medina V., Viruel M. A., Laviña A., Batlle A. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 2003, vol. 52, no. 4, pp. 513–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00868.x>
11. Prezelj N., Nikolić P., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M. Spatiotemporal distribution of flavescence doree phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 2012, vol. 62, no. 4, pp. 760–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x>
12. Christensen N. M., Nicolaisen M., Hansen M., Schulz A. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant – Microbe Interactions*, 2004, vol. 17, no. 11, pp. 1175–1184. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1175>
13. Smart C. D., Schneider B., Blomquist C. L., Guerra L. J., Harrison N. A., Ahrens U., Lorenz K. H., Seemüller E., Kirkpatrick B. C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62, no. 8, pp. 2988–2993. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2988-2993.1996>
14. Lorenz K.-H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathology*, 1995, vol. 85, pp. 771–776. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-771>
15. Deng S., Hiruki C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, vol. 14, no. 1, pp. 53–61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
16. Razin S., Tully J. G. (ed.). *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego, Academic Press, 1995. 483 p.
17. Gundersen D. E., Lee I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 1996, vol. 35, no. 3, pp. 144–151.
18. Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D. E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, 1995, vol. 85, pp. 728–735. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-728>
19. Schneider B., Seemüller E. Strain differentiation of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ by SSCP and sequence analyses of the *hflB* gene. *Journal Plant Pathology*, 2009, vol. 91, no. 1, pp. 103–112.
20. Schaper U., Seemüller E. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology*, 1982, vol. 72, pp. 736–742. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-736>
21. Green M. J., Thompson D. A., MacKenzie D. J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 1999, vol. 83, no. 5, pp. 482–485. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.482>
22. Waterworth H. E., Mock R. An Assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm. *Plant Disease*, 1999, vol. 83, no. 11, pp. 1047–1050. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.11.1047>

### Информация об авторах

*Божидай Татьяна Николаевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, а/г Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: [tanya\\_bozhidaj@mail.ru](mailto:tanya_bozhidaj@mail.ru)

*Колбанова Елена Вячеславовна* – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, а/г Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: [kolbanova@tut.by](mailto:kolbanova@tut.by)

*Кухарчик Наталья Валерьевна* – д-р с/х наук, профессор, заведующий отделом. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, а/г Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь). E-mail: [nkykharchyk@gmail.com](mailto:nkykharchyk@gmail.com)

### Information about the authors

*Tatsiana N. Bazhydai* – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute for Fruit Growing (2, Kovalyov Str., 223013, a/c Samokhvalovichy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: [tanya\\_bozhidaj@mail.ru](mailto:tanya_bozhidaj@mail.ru)

*Elena V. Kolbanova* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute for Fruit Growing (2, Kovalyov Str., 223013, a/c Samokhvalovichy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: [kolbanova@tut.by](mailto:kolbanova@tut.by)

*Natallia V. Kukharchyk* – D. Sc. (Agric.), Professor, Head of the Department. Institute for Fruit Growing (2, Kovalyov Str., 223013, a/c Samokhvalovichy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: [nkykharchyk@gmail.com](mailto:nkykharchyk@gmail.com)