

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 // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бот. наук. – 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. Seriya 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 переменных 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 плодородия» 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	

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

2) начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °С в течение 30 с, при 50 °С в течение 30 с (для праймеров P1/P7) и при 55 °С в течение 30 с (для праймеров R16F2n/R16R2) и при 72 °С в течение 2 мин; при 72 °С 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 °С в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °С в течение 30 с, при 50 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 1 мин; при 72 °С 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 °С в течение 2 мин; 45 циклов при 95 °С в течение 5 с, при 60 °С в течение 30 с и при 67 °С в течение 15 мин.

Амплифицированные 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

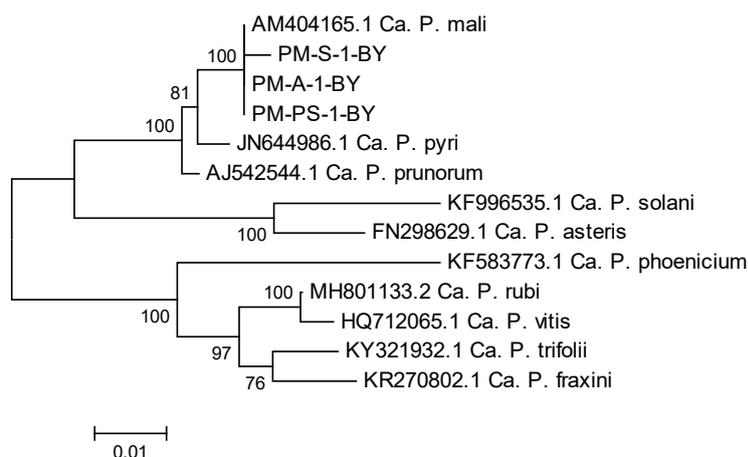


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей участка 16S rRNA гена изолятов различных видов *Candidatus Phytoplasma*

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 %.

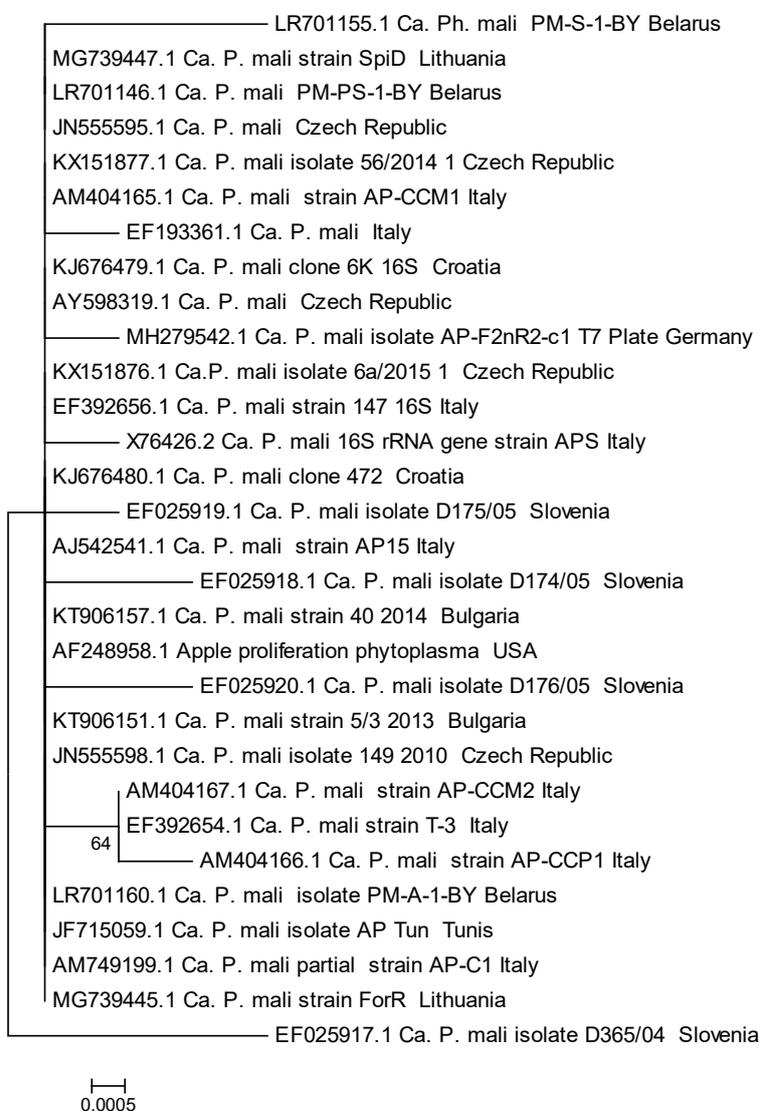
Филогенетическое дерево, представленное на рис. 3, отражает степень генетического сходства изолятов *Ca. P. mali*. Кластерный анализ изучаемых и ранее опубликованных нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена изолятов *Ca. P. mali* показал, что последовательности были близкородственны, 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*

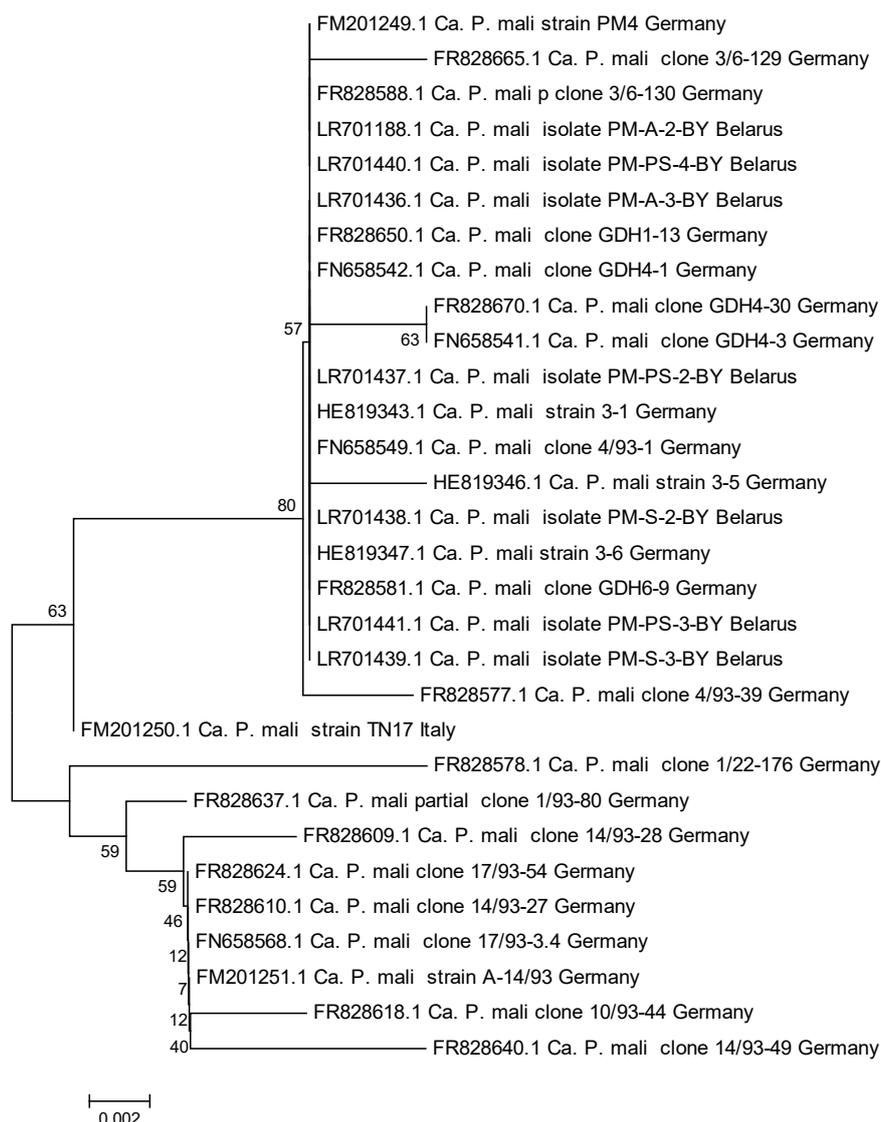


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента *hflB* гена для штаммов *Ca. P. mali*

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.

Заклучение. 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. Prezlj [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., Ravnika 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>

Інфармацыя аб аўтарах

Божыдай Тат'яна Ніколаевна – канд. біол. навук, ст. науч. супрацоўнік. Інстытут плодаводства (ул. Ковалева, 2, 223013, а/г Самохваловічы, Мінскі раён, Рэспубліка Беларусь). E-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru

Колбанова Елена Вячаславаўна – канд. біол. навук, доцэнт, заведуючы лабараторыяй. Інстытут плодаводства (ул. Ковалева, 2, 223013, а/г Самохваловічы, Мінскі раён, Рэспубліка Беларусь). E-mail: kolbanova@tut.by

Кухарчык Натал'я Валер'евна – д-р с/х навук, прафэсар, заведуючы аддзелам. Інстытут плодаводства (ул. Ковалева, 2, 223013, а/г Самохваловічы, Мінскі раён, Рэспубліка Беларусь). E-mail: 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

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

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