

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ (ПЦР, DAS-ELISA) ДИАГНОСТИКИ ФИТОПЛАЗМЫ ЯБЛОНИ В БЕЛАРУСИ

Е. В. КОЛБАНОВА, Т. Н. БОЖИДАЙ, Н. В. КУХАРЧИК

*РУП «Институт плодоводства»,  
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,  
e-mail: kolbanova@tut.by*

### АННОТАЦИЯ

Методом ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P фитоплазма яблони была обнаружена у 17 образцов из 25 тестируемых, все 8 деревьев, имеющие визуальные симптомы («ведьмины метлы»), показали положительный результат.

Использование DAS-ELISA-теста в середине лета (июль) для диагностики фитоплазмы яблони дало 88,2 % ложноотрицательных результатов: из 17 зараженных образцов, выявленных методом ПЦР, только 2 образца оказались положительными. Использование DAS-ELISA-теста осенью (сентябрь) также оказалось малорезультативным – 70,6 % ложноотрицательных результатов (из 17 зараженных образцов, выявленных методом ПЦР, только 5 образцов показали положительный результат).

Метод ПЦР в реальном времени по сравнению с DAS-ELISA-тестом является более эффективным методом для диагностики фитоплазмы яблони.

*Ключевые слова:* яблоня, фитоплазма, ДНК, ПЦР, ИФА, Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно «Единым карантинным фитосанитарным требованиям, предъявляемым к подкарантинной продукции и подкарантинным объектам на таможенной границе и на таможенной территории Евразийского экономического союза», утвержденным Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 157, *Candidatus* Phytoplasma mali относится к опасным болезням и является обязательным для диагностики при выделении растений в супер-супер элиту.

В результате накопления во флоэме фитоплазм происходит отмирание отдельных ее тканей. 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 [1].

Фитоплазменная инфекция часто приводит к гибели растений и наносит опустошительный ущерб сельскохозяйственному производству. Так, в 2001 г. вспышка фитоплазменных заболеваний в насаждениях яблони причинила убытки на сумму около 100 млн евро в Италии и 25 млн евро в Германии [2].

Привлечение современных методов диагностики позволяет установить фитосанитарный статус растений в насаждениях, своевременно выбраковать больные растения и выделить незараженные растения для создания маточно-черенковой базы [3, 4]. Основным методом выявления фитоплазм является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Надежность ПЦР-анализа определяется концентрацией фитоплазм в растении-хозяине. Она в свою очередь может варьировать в зависимости от штамма или вида фитоплазмы, вида растения-хозяина, периода развития инфекции и погодных условий [5–8].

Также для выявления возбудителя пролиферации яблони были разработаны коммерческие наборы для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) [9]. ИФА является наиболее распространенным методом для крупномасштабного рутинного тестирования различных патогенов. Однако отмечается, что не все изоляты фитоплазмы можно диагностировать с использованием разработанных антител [10].

*Цель исследования* – оценить эффективность ПЦР и иммуноферментного анализа для диагностики белорусских изолятов фитоплазмы яблони.

## МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в рамках задания 2.56 «Оценка распространенности, диагностика латентных форм и идентификации фитоплазм яблони молекулярно-генетическими методами» подпрограммы «Сохранение и повышение плодородия почв» Государственной программы научных исследований «Качество и эффективность агропромышленного производства» (2016–2020 гг.).

Материалом для исследования служили корни и листья деревьев яблони (*Malus domestica* Borkh.) сортов Память Сикоры, Алеся (подвой 54-118, 2006 г. посадки).

**ПЦР в реальном времени.** ДНК выделяли коммерческим набором реактивов Genomic DNA Purification Kit (Termo Scientific, Литва). 50 мг растительного материала (проводящие ткани корней) растирали пестиком в ступке с жидким азотом до получения пудры. К измельченному материалу добавляли 600 мкл лизирующего буфера, продолжая растирать. Затем смесь переносили в 2-миллиметровые микроцентрифужные пробирки, интенсивно перемешивали при помощи вортекса, затем инкубировали 10 мин при 65 °С. Сразу после нагревания к содержимому микроцентрифужных пробирок добавляли 600 мкл хлороформа, содержимое аккуратно перемешивали переворачиванием (3–5 раз), центрифугировали 5 мин (14 000 об/мин). Переносили надосадочную жидкость, содержащую ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку и добавляли 800 мкл свежеприготовленного осаждающего раствора. Аккуратно перемешивали переворачиванием в течение 1–2 мин, инкубировали при комнатной температуре в течение 5–10 мин и центрифугировали 2 мин (14 000 об/мин). Супернатант сливали, осадок ДНК растворяли в 100 мкл 1,2 М NaCl, перемешивая на вортексе. В раствор добавляли 300 мкл холодного 90 %-ного этанола, перемешивали и инкубировали при –20 °С в течение 10 мин. ДНК осаждали центрифугированием в течение 5 мин (14 000 об/мин). Сливали этанол, промывали осадок 300 мкл 70 %-ным холодным этанолом. ДНК осаждали центрифугированием в течение 5 мин (14 000 об/мин), спирт удаляли. Осадок ДНК высушивали в термостате при температуре 30 °С в течение 30 мин. Растворяли осажденную ДНК в 50 мкл элюирующего буфера.

Измерение концентрации ДНК в полученном растворе проводили с помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Implen, Германия).

Выделенную ДНК использовали для полимеразной цепной реакции в реальном времени. Список праймеров представлен в таблице 1.

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Праймер	Последовательность (5'–3')	Источник
Phyto-F	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA	[11]
Phyto-R	TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA	
Phyto-P	FAM-TGACGGGACTCCGCACAAGCG-BHQ-1	

Аmplификацию проводили с использованием ArtStart ДНК-полимеразы (АртБиоТех, Беларусь) и амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США).

Условия проведения амплификации: начальная денатурация при 95 °С в течение 2 мин; 45 циклов при 95 °С в течение 5 с, 60 °С в течение 30 с и 67 °С в течение 15 мин.

**Иммуноферментный анализ.** Тестирование растений на наличие *Candidatus Phytoplasma mali* проводили методом DAS-ELISA с использованием диагностического набора фирмы BIOREBA (Швейцария). Растительный материал (согласно рекомендациям производителя) – жилки листьев яблони.

Специфические антитела разводили в покровном буфере в соотношении 1:1000 и вносили их в лунки микроплат по 200 мкл, которые затем инкубировали 4 часа при 30 °С. После этого, проводили трехкратную промывку промывающим буфером при помощи вошера PW 40 (Bio-Rad, Франция).

Проводили гомогенизацию растительного материала в индивидуальном пластиковом пакете с добавлением экстрагирующего буфера в соотношении 1:10.

В лунки микроплат вносили экстракт каждого тестируемого образца (по 200 мкл) и оставляли на ночь при температуре +4 °С. На следующий день осуществляли трехкратную промывку с помощью вошера.

Разведенные в конъюгирующем буфере конъюгирующие антитела в соотношении 1:1000 вносили в лунки микроплат по 200 мкл и инкубировали 5 часов при 30 °С, затем проводили трехкратную промывку.

P-нитрофенилфосфат, растворенный в субстратном буфере, вносили в лунки микроплат и инкубировали при комнатной температуре в темноте.

Регистрация результатов велась на автоматическом ридере iMark 1.02.01.R Microplate Reader (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Сравнивали показатели оптической плотности анализируемых образцов ( $A_0$ ) с показателями оптической плотности отрицательного контроля ( $A_k$ ). Положительными считали образцы, значение оптической плотности у которых превышало среднюю оптическую плотность отрицательного контроля больше чем в 2 раза. Повторность анализа каждого образца двукратная. Для каждой отдельной микроплат использовали свой положительный и отрицательный контроль.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для тестирования на наличие фитоплазмы в насаждениях яблони методом ПЦР в реальном времени были взяты образцы (корни) в сентябре с 24 деревьев яблони сорта Память Сикоры, 8 из которых имели визуальные симптомы *Candidatus Phytoplasma mali* – «ведьмины метлы» (см. рисунок) и с 1 дерева яблони сорта Алеся. Методом DAS-ELISA протестировано 72 образца, включая и образцы, которые тестировали ПЦР.

Методом ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P фитоплазма была обнаружена у 17 образцов из 25 тестируемых, все 8 деревьев, имеющие визуальные симптомы («ведьмины метлы»), показали положительный результат (табл. 2).



Побеги яблони сорта Память Сикоры с симптомами поражения фитоплазмой

Таблица 2. Результаты тестирования яблони на наличие фитоплазмы методом ПЦР и DAS-ELISA

Сорт	№ образца (ряд-место)	Визуальные симптомы	Результат		
			ПЦР	DAS-ELISA	
				июль 2019 г.	сентябрь 2019 г.
Память Сикоры	1-1	+*	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	1-2	+	<b>полож.</b>	отр.	<b>полож.</b>
	1-3	-	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	1-4	-	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	1-5	-	отр.	отр.	отр.
	1-6	+	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
	1-7	+	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	1-8	-	отр.	отр.	отр.
	1-9	-	отр.	отр.	отр.
	1-10	-	<b>полож.</b>	отр.	<b>полож.</b>
	1-11	-	н/т**	отр.	отр.
	1-12	-	н/т	отр.	отр.
	1-13	-	н/т	отр.	отр.
	1-14	-	н/т	отр.	отр.
	1-15	-	н/т	отр.	отр.
	1-16	-	н/т	отр.	отр.
	1-17	-	н/т	отр.	отр.
	1-18	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-19	+	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>	<b>полож.</b>
	1-20	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-21	+	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	1-22	-	н/т	отр.	отр.
	1-23	-	н/т	отр.	отр.
	1-24	-	н/т	отр.	отр.
	1-25	-	н/т	отр.	отр.
	1-26	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-27	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-28	-	н/т	отр.	отр.
	1-29	-	н/т	отр.	отр.
	1-30	-	н/т	отр.	отр.
	1-31	-	н/т	отр.	отр.
	1-32	-	н/т	отр.	отр.
	1-33	-	н/т	отр.	отр.
	1-34	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-35	-	н/т	отр.	отр.
	1-36	+	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	1-37	-	н/т	отр.	отр.
	1-38	-	н/т	отр.	отр.
	1-39	-	н/т	отр.	отр.
	1-40	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-41	-	н/т	отр.	отр.
	1-42	-	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-43	-	н/т	отр.	отр.
	1-44	-	н/т	отр.	отр.
	1-45	+	<b>полож.</b>	отр.	<b>полож.</b>
	1-46	-	н/т	отр.	отр.
	1-47	-	н/т	отр.	отр.
	1-48	-	н/т	отр.	отр.
	1-49	-	н/т	отр.	отр.
	1-50	-	н/т	отр.	отр.
	1-51	-	н/т	отр.	отр.
	1-52	-	н/т	отр.	отр.

Сорт	№ образца (ряд-место)	Визуальные симптомы	Результат		
			ПЦР	DAS-ELISA	
				июль 2019 г.	сентябрь 2019 г.
Память Сикоры	1-53	–	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-54	–	н/т	отр.	отр.
	1-55	–	н/т	отр.	отр.
	1-56	–	н/т	отр.	отр.
	1-57	–	н/т	отр.	отр.
	1-58	–	н/т	отр.	отр.
	1-59	–	н/т	отр.	отр.
	1-60	–	н/т	отр.	<b>полож.</b>
	1-61	–	н/т	отр.	отр.
	2-1	–	отр.	отр.	отр.
	2-2	–	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	2-3	–	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	2-4	–	отр.	отр.	отр.
	2-5	–	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	3-1	–	отр.	отр.	отр.
	3-2	–	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	3-3	–	отр.	отр.	отр.
	3-4	–	<b>полож.</b>	отр.	отр.
	3-5	–	отр.	отр.	отр.
Алеся	6-3	–	<b>полож.</b>	отр.	отр.

Примечание: \* (+) – визуальные симптомы («ведьмины метлы») на дереве есть, (–) – визуальные симптомы отсутствуют, \*\*н/т – тестирование не проводилось.

Использование DAS-ELISA-теста в середине лета (июль) для диагностики фитоплазмы яблони дало 88,2 % ложноотрицательных результатов: из 17 зараженных образцов, выявленных методом ПЦР, только 2 образца оказались положительными при тестировании методом DAS-ELISA. Использование DAS-ELISA-теста осенью (сентябрь) также оказалось малорезультативным – 70,6 % ложноотрицательных результатов (из 17 зараженных образцов, выявленных методом ПЦР, только 5 образцов показали положительный результат). Из 47 образцов, которые тестировались только DAS-ELISA-тестом в летний и осенний периоды, 9 образцов при тестировании в осенний период показали положительный результат (табл. 2).

Таким образом, метод ПЦР в реальном времени по сравнению с DAS-ELISA-тестом является более эффективным методом для диагностики фитоплазмы яблони. Возможно, для получения минимального количества ложноотрицательных результатов методом иммуноферментного анализа при диагностике фитоплазмы яблони тестирование необходимо проводить в позднесенний период и в качестве образцов использовать не листья, а корни, как для ПЦР.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ПЦР в реальном времени с праймерами Phyto-F/Phyto-R и зондом Phyto-P фитоплазма яблони была обнаружена у 17 образцов из 25 тестируемых, все 8 деревьев, имеющие визуальные симптомы («ведьмины метлы»), показали положительный результат.

Использование DAS-ELISA-теста в середине лета (июль) для диагностики фитоплазмы яблони дало 88,2 % ложноотрицательных результатов: из 17 зараженных образцов, выявленных методом ПЦР, только 2 образца оказались положительными. Использование DAS-ELISA-теста осенью (сентябрь) также оказалось малорезультативным – 70,6 % ложноотрицательных результатов (из 17 зараженных образцов, выявленных методом ПЦР, только 5 образцов показали положительный результат).

Метод ПЦР в реальном времени по сравнению с DAS-ELISA-тестом является более эффективным методом для диагностики фитоплазмы яблони.

## ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Maejima, K. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria / K. Maejima, K. Oshima, Sh. Namba // *Journal of General Plant Pathology*. – 2014. – Vol. 80 – P. 210–221.
2. 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.
3. Bertaccini, A. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research / A. Bertaccini, B. Duduk // *Phytopathologia Mediterranea*. – 2009. – Vol. 48, № 3. – P. 355–378.
4. Marzachi, C. Molecular diagnosis of phytoplasmas / C. Marzachi // *Arab Journal of Plant Protection*. – 2006. – Vol. 24, № 2. – P. 139–142.
5. Berges, R. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction / R. Berges, M. Rott, E. Seemuller // *Phytopathology*. – 2000. – Vol. 90. – P. 1145–1152.
6. Constable, F. E. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines / F.E. Constable, K. S. Gibb, R. H. Symons // *Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 52. – P. 267–276.
7. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars / M. Garcia-Chapa [et al.] // *Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 52. – P. 513–520.
8. Spatiotemporal distribution of flavescence doree phytoplasma in grapevine / N. Prezelj [et al.] // *Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 62. – P. 760–766.
9. Detection of apple proliferation by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees / J. Brzin [et al.] // *Plant Diseases and Protection*. – 2003. – Vol. 110. – P. 476–483.
10. Spreading and characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ subtypes in different growing areas / M. Martini [et al.] // *Petria*. – 2005. – Vol. 15. – P. 105–107.
11. 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, № 11. – P. 1175–1184.

## COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF LABORATORY METHODS OF DIAGNOSTICS (PCR, DAS-ELISA) OF PHYTOPLASMA DISEASES OF APPLE IN BELARUS

E. V. KOLBANOVA, T. N. BOZHIDAY, N. V. KUKHARCHYK

### Summary

Using real-time PCR with primer pair Phyto-F/Phyto-R and probe Phyto-P, phytoplasma diseases of apple was detected in 17 samples of 25 tested, all the 8 trees with visual symptoms («witches’ broom») showed a positive result.

88.2 % of false-negative results were obtained using the DAS-ELISA test in mid-summer (July) for diagnosis of phytoplasma diseases of apple (only 2 samples were positive from 17 infected samples detected by PCR). 70.6 % of false-negative results (only 5 samples were positive from 17 infected samples detected by PCR) were obtained using the DAS-ELISA test in the fall (September).

Real-time PCR compared with the DAS-ELISA test is a more effective method for the diagnosis of phytoplasma diseases of apple.

*Keywords:* apple, phytoplasma, DNA, PCR, ELISA, Belarus.

*Поступила в редакцию 15.04.2020 г.*