

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ ФИТОПЛАЗМЫ МАЛИНЫ

Т. Н. БОЖИДАЙ, Е. В. КОЛБАНОВА

РУП «Институт плодородства»,  
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,  
e-mail: belhort@belsad.by

### АННОТАЦИЯ

Сравнение нуклеотидных последовательностей выделенных изолятов с последовательностями, представленными в международной базе данных, показало, что все белорусские изоляты фитоплазмы, выделенные из малины сортов Вольница, Улада, Спутница, Бальзам, Гусар и гибрида 06/1-02-12, относятся к виду *Ca. P. rubi*. Степень идентичности исследуемых нуклеотидных последовательностей белорусских изолятов *Ca. P. rubi* и последовательностей из международной базы данных колеблется в пределах 99,21–100,0 %. Кластерный анализ изучаемых и ранее опубликованных нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена изолятов *Ca. P. rubi* показал, что корреляции между группированием изолятов и их географическим происхождением, а также в зависимости от растения, из которого был выделен изолят, не обнаружено.

*Ключевые слова:* малина, фитоплазма, ДНК, ПЦР, филогенетический анализ, Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

Наиболее экономически важным заболеванием малины является израстание малины (*Candidatus Phytoplasma rubi*). Характерный симптом поражения малины фитоплазмой – образование массы адвентивных (придаточных) почек на корнях, из которых в виде пучков развивается большое количество (до 300 шт.) тонких побегов (из-за этого заболевание получило свое название). Побеги значительно короче здоровых, при сильном поражении длина их может составлять всего 10–15 см. Подвержены заболеванию как молодые, так и старые растения малины. Листья хлоротичные, мелкие, видоизмененные. Иногда болезнь проявляется израстанием не только вегетативной части, но и генеративной. Части цветка становятся листоподобными, пестики и тычинки недоразвитые и, как следствие, стерильные [1–3].

Еще одним признаком израстания малины является карликовость. Кусты отстают в росте. В такой форме они могут прожить до десяти лет, не выздоравливая и слабея с каждым годом. Иногда инфицированные кусты зимой вымерзают [2].

Потери урожая от фитоплазмы израстания достигают 80–90 %, но нередки случаи полной стерильности растений и их гибели. После двух – трех лет заражения общий рост зараженных растений ослабевает или прекращается совсем, плодоносящих побегов не образуется [4].

В регионе ЕРРО фитоплазма входит в список объектов, рекомендуемых для сертификационных схем производства безвирусного посадочного материала малины [5].

Основным методом выявления фитоплазмы является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Разработан ряд универсальных праймеров для ПЦР, обеспечивающих амплификацию участка 16S rRNA гена различных фитоплазм [6–10].

Достоверными методами определения вида фитоплазмы является секвенирование участков генома и их дальнейшее сравнение с депозитами, относящимися к разным видам из международной генетической базы данных.

*Цель исследования* – молекулярно-генетическая идентификация нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена белорусских изолятов фитоплазмы малины и сравнительный анализ с последовательностями, представленными в международной базе данных.

### МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в рамках НИР 1.5.6 «Молекулярно-генетическая идентификация, диагностика и распространенность фитоплазменных патогенов ягодных культур в Беларуси» (№ ГР 20213194) задания 1.5 «Изучение

состава, структуры и процессов формирования биологического разнообразия вредителей, болезней и сорных растений в агроценозах для научного обоснования интегрированных систем защиты растений», ГПНИ «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность».

Объекты исследования – фитоплазма малины.

Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенные из растений малины с симптомами фитоплазмы (рис. 1).

ДНК выделяли коммерческим набором реактивов GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Литва). Измерение концентрации ДНК в полученном растворе проводили с помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Implen, Германия).

ДНК использовали для полимеразной цепной реакции с вложенной парой праймеров (гнездовая ПЦР). Праймеры, используемые в работе, приведены в табл. 1 [7–10].

Аmplификацию проводили с использованием Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Литва) и амплификатора C1000 Touch (Bio-Rad, США).

Условия проведения гнездовой ПЦР: 95 °С в течение 5 мин; 35 циклов при 95 °С в течение 30 с, 50 °С в течение 30 с (для праймеров P1/P7) и 55 °С в течение 30 с (для праймеров R16F2п/R16R2) и 72 °С в течение 2 мин; 72 °С в течение 5 мин.

Продукты амплификации после гнездовой ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

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



Рис. 1. Растения малины с симптомами поражения фитоплазмой

Таблица 1. Праймеры, использованные для диагностики фитоплазмы

Праймеры	Последовательность (5'-3')	Размер ожидаемого ПЦР-продукта, п. н.
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1800
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
R16F2п	GAAACGACTGCTAAGACTGG	1245
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAACCCCG	

Для просмотра секвенограмм применяли SnapGene Viewer 6.0.7. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программный пакет MEGA 11. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли при помощи Clustal W алгоритма. Филогенетические деревья были построены с помощью программы MEGA 11 методом Neighbour-Joining. Цифрами обозначены достоверности (в процентах) расхождения ветвей, выявленные с помощью бутстреп-анализа (1000 реплик), который позволяет оценить статистическую надежность каждого из узлов построенного древа. В случае бутстреп-поддержки ниже 70 % статистическая надежность данного узла считалась недостоверной.

Анализ идентичности нуклеотидных последовательностей всех исследуемых образцов осуществляли с использованием базы данных GenBank при помощи BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения молекулярно-генетического анализа были выделены шесть изолятов фитоплазм из зараженных растений малины. ДНК выделенных изолятов использовали для амплификации фрагмента 16S rRNA гена.

Продукты ПЦР-амплификации были использованы для определения нуклеотидной последовательности. Всего было секвенировано 6 фрагментов 16S rRNA гена фитоплазмы, выделенных из 6 зараженных растений.

В результате проведенных исследований были получены данные о нуклеотидных последовательностях участка 16S rRNA гена белорусских изолятов фитоплазмы малины. Длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 379–608 нуклеотидов (табл. 2).

Таблица 2. Выделенные из растений малины белорусские изоляты фитоплазмы

Гибрид/сорт	Название изолята	Длина фрагмента ДНК, п. н.
06/1-02-12	PR-h-BY	434
Вольница	PR-V-BY	570
Усада	PR-U-BY	530
Спутница	PR-S-BY	379
Бальзам	PR-B-BY	568
Гусар	PR-G-BY	608

С помощью анализа последовательности генов и их дальнейшего сравнения с генотипами разных видов фитоплазм из международной базы данных можно избежать неверного определения вида изолятов фитоплазм. Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента 16S rRNA гена шести белорусских изолятов сравнивали с последовательностями, кодирующими ту же область различных видов фитоплазм, представленных в международной базе данных (EMBL/GenBank) (табл. 3).

Таблица 3. Изоляты различных видов *Candidatus Phytoplasma*, нуклеотидные последовательности которых использованы для филогенетического анализа

GenBank №	Вид фитоплазмы	Таксономическая группа
FN298629.1	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	16SrI – Aster yellows group
OP935760.1	<i>Candidatus Phytoplasma australasia</i>	16SrII – Peanut WB group
KX470429.1	<i>Candidatus Phytoplasma pruni</i>	16SrIII – X-disease group
KF716177.2	' <i>Acrocomia aculeata</i> ' palm phytoplasma	16SrIV – Coconut lethal yellows group
KF583773.1	<i>Candidatus Phytoplasma phoenicium</i>	16SrIX – Pigeon pea witches'-broom group
MH801133.2	<i>Candidatus Phytoplasma rubi</i>	16SrV – Elm yellows group
KY321932.1	<i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i>	16SrVI – Clover proliferation group
MW264918.1	<i>Candidatus Phytoplasma castaneae</i>	16SrVI – Clover proliferation group
KR270802.1	<i>Candidatus Phytoplasma fraxini</i>	16SrVII – Ash yellows group
MT431551.1	<i>Candidatus Phytoplasma stylosanthis</i>	16SrVIII – Loofah witches'-broom group
AJ542544.1	<i>Candidatus Phytoplasma prunorum</i>	16SrX – Apple proliferation group
AM404165.1	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>	16SrX – Apple proliferation group
JN644986.1	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i>	16SrX – Apple proliferation group
R869146.1	<i>Candidatus Phytoplasma cirsi</i>	16SrXI – Rice yellow dwarf group
HM104662.1	<i>Candidatus Phytoplasma fragariae</i>	16SrXII – Stolbur group
KF996535.1	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	16SrXII – Stolbur group
KX789085.1	<i>Candidatus Phytoplasma hispanicum</i>	16SrXIII – Mexican periwinkle virescence group
ON568305.1	<i>Candidatus Phytoplasma cynodontis</i>	16SrXIV – Bermuda white leaf group
ON000496.1	<i>Candidatus Phytoplasma brasiliense</i>	16SrXV – Hibiscus witches'-broom group
KY047493.1	<i>Candidatus Phytoplasma omanense</i>	16SrXXIX – Cassia witches'-broom group

Для проведения анализа филогенетического положения исследуемых видов фитоплазм было проанализировано 20 фрагментов ДНК изолятов различных видов *Candidatus Phytoplasma*, относящихся к 16 таксономическим группам.

На филогенетическом дереве (рис. 2), построенном с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей участка 16S rRNA гена изолятов различных видов *Candidatus Phytoplasma*, все изучаемые образцы образовывали один кластер

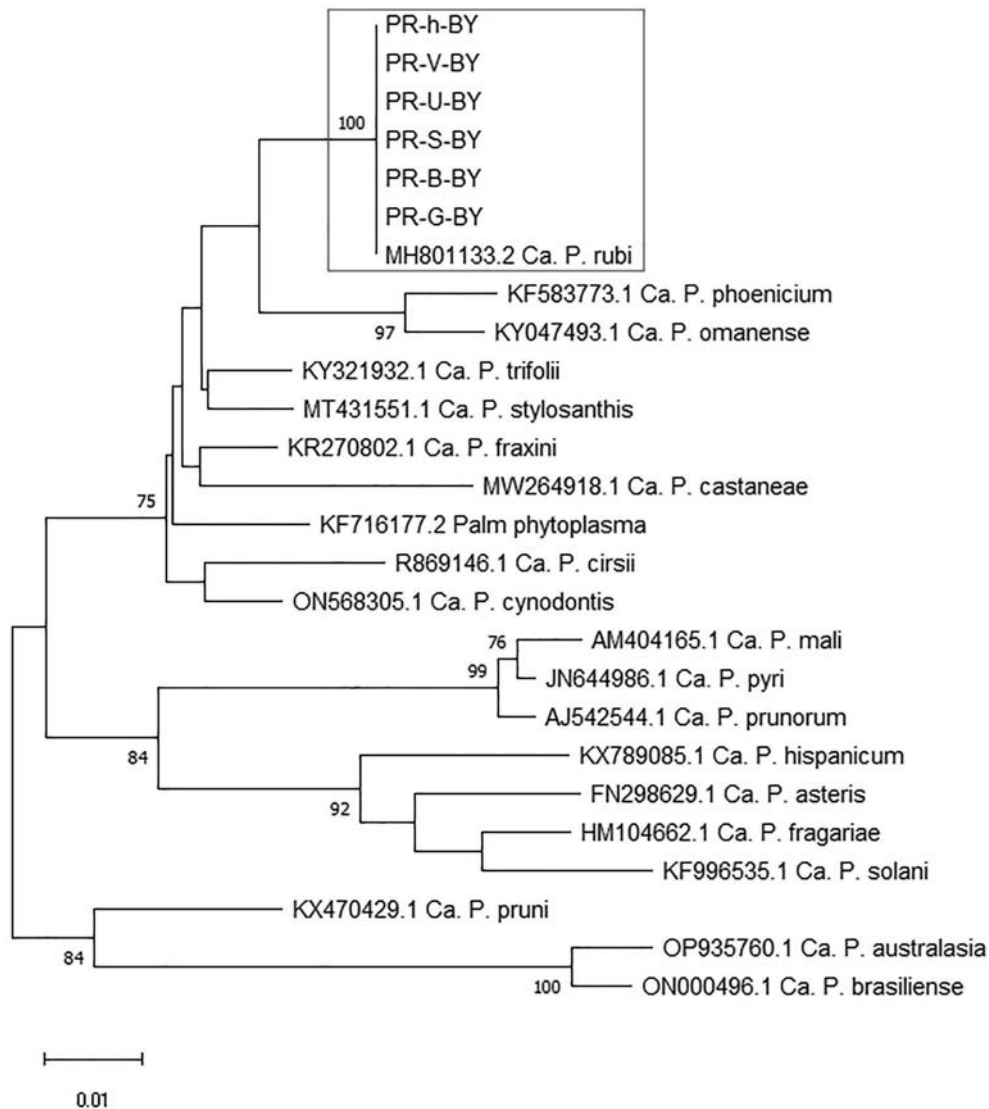


Рис. 2. Филогенетическое дерево 26 фрагментов 16S rRNA гена изолятов различных видов *Candidatus Phytoplasma*

с изолятом *Ca. P. rubi* (MH801133.2) с бутстреп-поддержкой 100 %, это позволяет сделать вывод о том, что все белорусские изоляты фитоплазмы, выделенные из малины сортов Вольница, Услада, Спутница, Бальзам, Гусар и гибрида 06/1-02-12, относятся к виду *Ca. P. rubi* (*Rubus stunt phytoplasma*, израстание малины), принадлежащему группе 16SrV (*Elm yellows group*).

С целью сравнения нуклеотидных последовательностей белорусских изолятов *Ca. P. rubi* с изолятами, представленными в международной генетической базе данных (EMBL/GenBank), проведен анализ нуклеотидных последовательностей в системе NCBI BLAST.

Степень идентичности исследуемых нуклеотидных последовательностей белорусских изолятов фитоплазмы и последовательностей из международной базы данных (EMBL/GenBank) колеблется в пределах 99,21–100,0 % (табл. 4).

Сопоставление полученных последовательностей с 10 известными последовательностями 16S rRNA генов различных изолятов фитоплазмы малины позволило построить филогенетическое дерево (рис. 3). Изоляты разделились на два кластера (отдельным кластером выделились изоляты AY197648.1, HM118514.1, MN279544.1, CP114006.1) с бутстреп-поддержкой ниже 70 %, следовательно, статистическая надежность данных узлов не достоверна.

Таблица 4. Идентичность нуклеотидных последовательностей участка 16S rRNA гена белорусских изолятов фитоплазмы малины и последовательностей из международной базы данных

GenBank №	Растение, из которого выделен изолят	Страна происхождения	Идентичность нуклеотидных последовательностей, %					
			PR-h-BY	PR-V-BY	PR-U-BY	PR-S-BY	PR-B-BY	PR-G-BY
AY197648.1	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Италия	99,77	99,82	99,81	99,74	99,82	99,84
AY197649.1	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Италия	100,0	99,82	99,81	100,0	99,82	99,84
AY197650.1	<i>Rubus idaeus</i> L.	Швейцария	100,0	99,82	99,81	100,0	99,82	99,84
AY197651.1	<i>Rubus caesius</i> L.	Германия	100,0	99,82	99,81	100,0	99,82	99,84
HM118514.1	<i>Rubus idaeus</i> L.	Литва	99,31	99,47	99,43	99,21	99,47	99,67
KX012939.1	<i>Rubus idaeus</i> L.	Россия	99,73	99,61	99,56	99,68	99,61	99,48
MH279544.1	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Германия	99,77	99,65	99,62	99,74	99,65	99,51
MH801133.2	<i>Rubus plicatus</i> Weihe & Nees	Бельгия	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Y16395.1	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Италия	99,77	99,82	99,81	99,74	99,82	99,51
CP114006.1	<i>Rubus caesius</i> L.	Германия	99,77	99,82	99,81	99,74	99,82	99,84

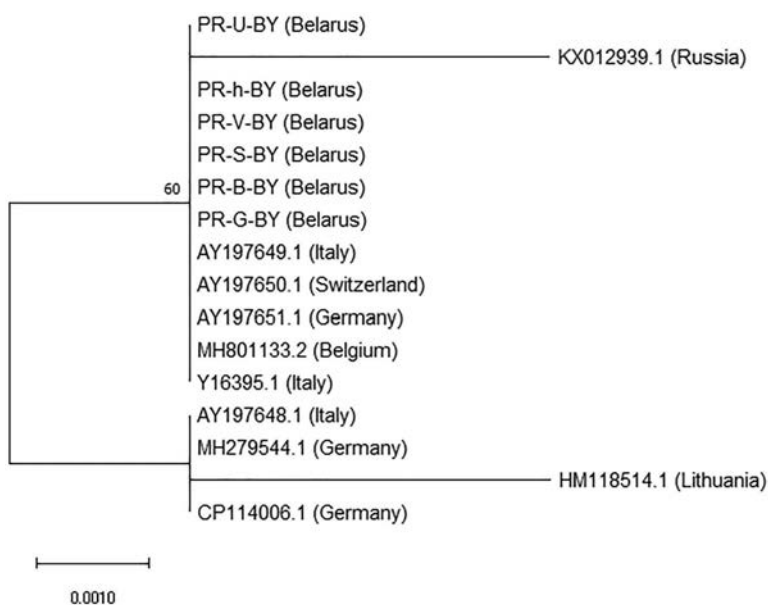


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена изолятов *Ca. P. rubi*

Кластерный анализ изучаемых и ранее опубликованных нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена изолятов *Ca. P. rubi*, выделенных на территории Италии, Бельгии, Литвы, Германии, Швейцарии, России, показал, что последовательности близкородственны, корреляции между группированием изолятов и их географическим происхождением не обнаружено. Кластеризация изолятов в зависимости от растения, из которого был выделен изолят, также не выявлена (см. рис. 3).

Последовательности фрагмента 16S rRNA гена всех изучаемых белорусских изолятов *Ca. P. rubi* (16SrV – Elm yellows group) депонированы в международной базе данных EMBL с присвоением идентификационных номеров: PR-h-BY – OX421881, PR-V-BY – OX421984, PR-U-BY – OX422044, PR-S-BY – OX421983, PR-B-BY – OX421985, PR-G-BY – OX422009.

Полученные нуклеотидные последовательности доступны в международной базе генетических данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Европейском нуклеотидном архиве ENA

(<https://www.ebi.ac.uk/ena>) и Японском банке данных ДНК DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj>) для дальнейшего использования исследователями для разработки методов видовой идентификации и других практических целей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, секвенировано 6 фрагментов 16S rRNA гена фитоплазмы, выделенных из 6 зараженных растений. Сравнение нуклеотидных последовательностей выделенных изолятов с последовательностями, представленными в международной базе данных, показало, что все белорусские изоляты фитоплазмы, выделенные из малины сортов Вольница, Услада, Спутница, Бальзам, Гусар и гибрида 06/1-02-12, относятся к виду *Ca. P. rubi*.

Степень идентичности исследуемых нуклеотидных последовательностей белорусских изолятов *Ca. P. rubi* и последовательностей из международной базы данных колеблется в пределах 99,21–100,0 %.

Кластерный анализ изучаемых и ранее опубликованных нуклеотидных последовательностей фрагмента 16S rRNA гена изолятов *Ca. P. rubi* показал, что корреляции между группированием изолятов и их географическим происхождением, а также в зависимости от растения, из которого был выделен изолят, не обнаружено.

Последовательности фрагмента 16S rRNA гена белорусских изолятов *Ca. P. rubi* депонированы в международную генетическую базу данных с присвоением идентификационных номеров (OX421881, OX421984, OX422044, OX421983, OX421985, OX422009).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кухарчик, Н. В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н. В. Кухарчик. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 209 с.
2. Матяшова, Г. А. Разработка и совершенствование методов диагностики фитоплазм – возбудителей болезней плодовых и ягодных культур : дис. ... канд. биол. наук : 06.01.07 / Г. А. Матяшова. – М., 2017. – 150 л.
3. Linck, H. Rubus stunt: a review of an important phytoplasma disease in *Rubus* spp. / H. Linck, A. Reineke // J. of Plant Diseases and Protection. – 2019. – Vol. 126. – P. 393–399.
4. Тихонова, К. О. Распространенность, вредоносность вирусных болезней и эффективные методы оздоровления малины : дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.07 / К. О. Тихонова. – М., 2016. – 127 л.
5. Certification scheme for *Rubus*. EPPO Standards PM 4/10 (2) // Bulletin OEPP/EPPO. – 2009. – Vol. 39. – P. 271–277.
6. Cieslinska, M. Detection and characterization of phytoplasmas associated with diseases of *Rubus* spp. in Poland / M. Cieslinska // J. of Plant Pathology. – 2011. – Vol. 93(1). – P. 51–56.
7. Deng, S. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes / S. Deng, C. Hiruki // J. of Microbiol. Methods. – 1991. – Vol. 14 (1). – P. 53–61.
8. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology / ed.: S. Razin, J. G. Tully. – San Diego : Acad. Press, 1995. – 483 p.
9. 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. – P. 144–151.
10. 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.

## IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF BELARUSIAN RASPBERRY PHYTOPLASMA ISOLATES

T. N. BOZHIDAI, E. V. KOLBANOVA

### Summary

Comparison of the nucleotide sequences of the recovered isolates with the sequences presented in the international database showed that all Belarusian phytoplasma isolates recovered from the Volnitsa, Uslada, Sputnitsa, Balsam, Gusar raspberry varieties and hybrid 06/1-02-12 belong to the species *Ca. P. rubi*. The degree of identity of the studied nucleotide sequences of the Belarusian isolates of *Ca. P. rubi* and sequences from the international database range from 99.21–100.0 %. Cluster analysis of the studied and previously published nucleotide sequences of the 16S rRNA fragment of the *Ca. P. rubi* showed that no correlation was found between the grouping of isolates and their geographical origin, as well as depending on the plant from which the isolate was recovered.

**Keywords:** raspberry, phytoplasma, DNA, PCR, phylogenetic analysis, Belarus.

Поступила в редакцию 17.03.2023