

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 12: Фитоплазмы

Принят в 2016 году; опубликован в 2016 году

СОДЕРЖАНИЕ

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Информация о вредном организме | 2 |
| 2. | Таксономическая информация | 3 |
| 3. | Обнаружение и идентификация | 3 |
| 3.1 | Стандартная вложенная ПЦР | 5 |
| 3.2 | ПЦР в реальном времени..... | 6 |
| 3.3 | Контроли молекулярных анализов | 7 |
| 3.4 | Интерпретация результатов ПЦР | 8 |
| 3.4.1 | Стандартная вложенная ПЦР | 8 |
| 3.4.2 | ПЦР в реальном времени..... | 8 |
| 3.5 | Секвенирование..... | 8 |
| 4. | Данные..... | 9 |
| 5. | Контактные адреса для дополнительной информации | 9 |
| 6. | Благодарности..... | 10 |
| 7. | Справочные материалы..... | 10 |

1. Информация о вредном организме

Первое описание фитоплазм принадлежит Doi *et al.* (1967), которые открыли их в ходе поиска возбудителя желтухи астры. Эти одноклеточные организмы получили название "микоплазмоподобных" вследствие своего морфологического сходства с микоплазмами животных и чувствительности к антибиотикам тетрациклинового ряда (Ishii *et al.*, 1967). Фитоплазмы – это облигатные прокариотные фитопатогенные организмы, не обладающие клеточной стенкой и имеющие различную форму. Средний диаметр – 200–800 нм. Они обнаруживаются в ситовидных клетках флоэмы растений-хозяев. Размер генома фитоплазм варьируется от 550 до 1500 Кб, относительно небольшой по сравнению с другими прокариотами, и в геноме отсутствует ряд функций, относящихся к биосинтезу (Marccone *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2013).

Наличие фитоплазм коррелирует с множеством разнообразных нарушений, выявляемых среди различных растений-хозяев (Lee *et al.*, 2000). Среди характерных симптомов отмечают такие явления, как виресценция (позеленение цветков и утрата их нормальной пигментации); филлодия (трансформация частей цветка в листовидные структуры); ведьмина метла (пролиферация добавочных или пазушных побегов) и другие виды аномального разрастания побегов и корней; пожелтение, покраснение и прочие нарушения окраски листьев; уменьшение размеров листьев и плодов; некроз флоэмы; общее увядание и задержка роста (Davis and Sinclair, 1998). Некоторые виды растений толерантны или устойчивы к фитоплазменной инфекции; при заражении этих растений расстройств не наблюдается или они слабо выражены (Lee *et al.*, 2000).

По оценкам Seemüller *et al.* (2002), к микоплазменной инфекции восприимчивы около 1000 видов растений. Большинство растений-хозяев фитоплазм являются двудольными. Реже фитоплазмы обнаруживаются в однодольных растениях, преимущественно в представителях семейств пальмовых и злаковых (Seemüller *et al.*, 2002).

Фитоплазмы встречаются по всему миру. Географическое распространение и ущерб от фитоплазменных болезней зависит от спектра хозяев фитоплазмы, а также от присутствия и пищевого поведения насекомых-переносчиков. Для некоторых фитоплазм характерен широкий спектр растений-хозяев и многоядные переносчики, и поэтому им свойственно широкое распространение. Другие фитоплазмы имеют ограниченный спектр хозяев и переносящие их насекомые – это олигофаги или монофаги, что ограничивает их географическое распространение. Обзор географического распространения основных таксономических групп фитоплазм приведен в работе Foissac и Wilson (2010).

Фитоплазмы могут передаваться через насекомых-переносчиков, повелику, а также путем прививки и распространяться посредством вегетативного размножения инфицированных частей растения. Спектр насекомых-переносчиков фитоплазм, в значительной степени определяющих их естественное распространение, ограничен цикадками и листоблошками, питающимися флоэмой (отряд полужесткокрылых (Hemiptera), подотряд цикадовых (Auchenorrhyncha)). Они устойчивым образом переносят данные фитопатогенные организмы. Weintraub и Beanland (2006) приводят свыше 90 видов с доказанной способностью выступать в качестве переносчиков, некоторые из которых могут переносить более одного вида фитоплазм. К другим механизмам передачи относятся повелика и прививка. Повелика (*Cuscuta* и *Cassytha* spp.) – это паразитические вьюнковые растения, образующие сосудистые соединения с растением-хозяином через гаустории. Если таким образом формируется мостик между двумя растениями – зараженным фитоплазмой и здоровым, – то фитоплазма может проникать в здоровое растение через сообщающиеся элементы флоэмы. Передачу через прививку и микрклональное размножение растений в культуре ткани можно использовать для поддержания популяции фитоплазм в справочных целях (IPWG, без даты публикации).

С более подробной информацией по фитоплазмам, включая фотографии проявлений болезней, перечень насекомых-переносчиков и базу данных по классификации фитоплазм, можно ознакомиться на следующих веб-сайтах: COST Action FA0807 Integrated Management of

Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems (<http://www.costphytoplasma.ipwgnnet.org/>) и Phytoplasma Resource Center (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>).

2. Таксономическая информация

| | |
|---------------------------------|---|
| Название: | фитоплазма |
| Синонимы: | микоплазмоподобный организм (МПО), микоплазма |
| Таксономическая позиция: | Bacteria, Firmicutes, Mollicutes, Acholeplasmatales, Acholeplasmataceae, 'Candidatus Phytoplasma' |

Подразделение по таксономии фитоплазм Рабочей группы по фитоплазмам/спироплазмам, действующей под эгидой Международной исследовательской программы по сравнительной микоплазмологии (IRPCM) разработало и опубликовало руководство по описанию видов 'Candidatus (Ca.) Phytoplasma' (IRPCM, 2004). Их определение основано на секвенировании рибосомного гена 16S (p)РНК, а также на биологических характеристиках. В целом, фитоплазмы данных видов в $\geq 97,5\%$ идентичны по ≥ 1200 нуклеотидов гена 16S pРНК. В тех случаях, когда в виды 'Ca.' включают фитоплазмы с различными биологическими характеристиками (по переносчикам и растениям-хозяевам), их можно таксономически классифицировать, используя специальные правила, предложенные IRPCM (2004). Описания видов 'Ca. Phytoplasma' публикуются в *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, и по состоянию на март 2015 года описано 37 таких видов.

3. Обнаружение и идентификация

Методом выбора для выявления фитоплазм является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Успешное молекулярное выявление фитоплазм определяется надлежащим взятием пробы растительной ткани и надежной методикой выделения нуклеиновой кислоты (Palmano, 2001; Firrao *et al.*, 2007). Фитоплазмы могут быть неравномерно распределены и содержаться в различных количествах (титре) в пределах растения, особенно в древесных растениях-хозяевах, поэтому предпочтительно использовать ткани с признаками поражения (Constable *et al.*, 2003; Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Necas and Kraska, 2006). В некоторых растениях-хозяевах инфекция может протекать бессимптомно, и при подозрении на такие случаи следует тщательно исследовать образцы из различных растительных тканей.

На надежность ПЦР-анализа влияет титр фитоплазм в растении-хозяине. Титр может быть различным в зависимости от штамма или вида фитоплазмы, вида растения-хозяина, времени развития инфекции и погодных условий. Важное значение имеет время взятия образцов растительных тканей, поскольку локализация в пределах растения и титр фитоплазм может зависеть от сезонных изменений (Seemüller *et al.*, 1984; Jarausch *et al.*, 1999; Berges *et al.*, 2000; Constable *et al.*, 2003; Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Prezelj *et al.*, 2012).

Для большинства болезней, вызванных фитоплазмой, оптимальным источником образцов для диагностического исследования, являются пораженные листья. Поскольку фитоплазмы обитают в ситовидных элементах флоэмы зараженных растений, для экстракции ДНК нередко используют черешки и жилки листьев, а также стебли или луб. В некоторых случаях (например, в отношении фитоплазмы X-болезни) наиболее высокий титр фитоплазм характерен для плодоножек (Kirkpatrick, 1991). Фитоплазмы можно обнаружить в соскобах с корней и коры деревьев во время сезонной спячки, однако в целом лучше всего проводить исследование на фитоплазмы в конце лета. Собранные растительные образцы можно до проведения исследования хранить при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ вплоть до шести месяцев. Более длительное хранение возможно при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ либо при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ после лиофильной или обычной сушки в присутствии хлорида кальция.

Описаны различные методы экстракции нуклеиновой кислоты в целях выявления фитоплазм с помощью ПЦР. В ряде методов перед экстракцией нуклеиновой кислоты предусмотрен этап

обогащения для повышения концентрации фитоплазм (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Ahrens and Seemüller, 1992; Prince *et al.*, 1993). Такая техника может быть полезной применительно к хозяевам, например к многолетним древесным растениям, в которых фитоплазмы содержатся в низком титре, или к "трудным" хозяевам, когда вместе с нуклеиновой кислотой нередко экстрагируются значительные количества таких соединений, как полисахариды и полифенолы, которые могут ингибировать ПЦР. В некоторых упрощенных методах растительные ткани измельчают непосредственно в коммерческом препарате лизирующего буфера или в буфере на основе бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ). В типичных случаях используют 2%-ный буфер ЦТАБ (было показано, что для винограда более надежным является применение 3%-ного раствора) (Daire *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 2001). Затем извлекают ДНК непосредственно из лизата с использованием коммерческих силикатных центрифужных колонок (Green *et al.*, 1999; Palmano, 2001), методом магнитной сепарации (Mehle *et al.*, 2013) либо с применением органических растворителей (Daire *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Метод магнитной сепарации лежит в основе систем автоматизированной экстракции нуклеиновой кислоты (например, в процессоре магнитных частиц KingFisher компании Thermo Scientific¹). Эффективность большинства методов экстракции подтверждена на практике применительно к разнообразным видам растений-хозяев. Выбор метода зависит от исследуемого растения и наличия лабораторий и необходимого оборудования. Из соображений практичности можно использовать тот или иной метод, включающий этап обогащения фитоплазм, для древесных многолетних растений и один из упрощенных методов – для травянистых растений-хозяев. Для проведения рутинной диагностики важно проводить валидацию метода экстракции применительно к конкретному хозяину в целях обеспечения надежности.

Разработан ряд универсальных праймеров ПЦР, обеспечивающих амплификацию гена 16S рРНК любой известной фитоплазмы. К наиболее часто используемым парам праймеров для проведения вложенной ПЦР относятся P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) и R16F2n/R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen and Lee, 1996). Пара праймеров P1/P7 амплифицирует продукт ПЦР-реакции, содержащий весь ген 16S рРНК, а также межгенный спейсер 16S/23S рРНК. По имеющимся сообщениям, ПЦР в реальном времени более или настолько же чувствительна, по сравнению с вложенной ПЦР, в зависимости от комбинации "хозяин–фитоплазма" (Christensen *et al.*, 2004) и обеспечивает более высокую пропускную способность тестирования, поскольку при этом не требуется постаmplификационная обработка. ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan характеризуется более высокой специфичностью и меньшим риском перекрестной контаминации, чем стандартная, в особенности вложенная, ПЦР. При использовании тест-систем ПЦР, рекомендуемых в настоящем протоколе, могут возникать ложноположительные результаты вследствие наличия близкородственных бактерий – вынужденный компромисс для универсального теста (Fránová, 2011; Pilotti *et al.*, 2014). В этих ситуациях можно прибегнуть к более специфичным ПЦР-тестам или, если результаты представляют повышенную важность (например, при исследовании образцов из карантина после ввоза, при выявлении нового хозяина или новых параметров распространения фитоплазм), следует выполнять секвенирование продукта ПЦР.

Помимо гена 16S рРНК методы ПЦР используются для амплификации других участков генома в целях выявления и классификации фитоплазм, включая гены рибосомных белков (Lim and Sears, 1992; Jomantiene *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Martini *et al.*, 2007), ген *tuf* (Schneider *et al.*, 1997; Makarova *et al.*, 2012), ген 23S рРНК (Guo *et al.*, 2003) ген *secY* (Lee *et al.*, 2010; Davis *et al.*,

¹ В настоящем диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

2013; Quaglino *et al.*, 2013). Эти праймеры могут быть полезными, если требуется исследовать второй независимый участок генома фитоплазмы.

Образцы могут содержать химические соединения, ингибирующие ПЦР, что зависит от вида растения-хозяина, а также от типа и биологического возраста растительной ткани. Поэтому важно проверять компетентность экстракции ДНК путем использования праймеров внутреннего контроля, амплифицирующих один из генов растения-хозяина. Ингибирующий эффект хозяина можно преодолеть путем дальнейшей очистки ДНК через сефакриловую центрифужную колонку или путем добавления бычьего сывороточного альбумина (БСА) в смесь ПЦР до получения концентрации 0,5 мг/мл (Kreader, 1996).

В настоящем диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

3.1 Стандартная вложенная ПЦР

В данном анализе для первого этапа ПЦР используются праймеры P1 (Deng and Hiruki, 1991) и P7 (Schneider *et al.*, 1995):

P1 (прямой): 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

P7 (обратный): 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

Праймеры для второго этапа ПЦР – R16F2n (Gundersen and Lee, 1996) и R16R2 (Lee *et al.*, 1993):

R16F2n (прямой): 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 (обратный): 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Реакционная смесь ПЦР (20 мкл): 1× Taq ДНК-полимеразный буфер, содержащий 1,5 mM MgCl₂, по 0,5 мкМ каждого праймера, 200 мкМ дНТФ, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы и 2 мкл ДНК-матрицы. Условия амплификации: начальный этап денатурации 2 мин при 94 °С; 40 циклов по 30 с при 94 °С; 30 с при 53 °С (праймеры P1/P7) или при 50 °С (праймеры R16F2n/R16R2); 1 мин при 72 °С; завершающий этап элонгации – 10 мин при 72 °С. Для вложенной ПЦР 1 мкл продуктов ПЦР на первом этапе используется либо в неразбавленном виде либо в разведении 1:30 в качестве матрицы для второго этапа ПЦР. Продукты ПЦР анализируют методом гель-электрофореза. Праймеры P1/P7 и R16F2n/R16R2 продуцируют ампликоны длиной соответственно в 1800 и 1250 пар нуклеотидов (п.н.).

Наличие ПЦР-компетентной ДНК в экстрактах подтверждается с использованием универсальных праймеров гена эукариот 28S рРНК (Werren *et al.* (1995):

28Sf (прямой): 5'-CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC-3'

28Sr (обратный): 5'-AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC-3'

Реакционная смесь для теста на 28S рРНК имеет тот же состав и обрабатывается при тех же условиях, что и при тесте на фитоплазмы, так что оба теста можно проводить одновременно в отдельных пробирках. Пара праймеров 28Sf/28Sr продуцирует ампликон длиной 500–600 п.н.

Для подтверждения ПЦР-компетентности ДНК можно использовать и другие пары праймеров.

3.2 ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени выполняют с использованием тест-системы TaqMan, которую разработали для гена 16S рРНК Christensen *et al.* (2004):

Прямой праймер: 5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'

Обратный праймер: 5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'

Зонд TaqMan: 5'-FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ-3'

В качестве альтернативного варианта можно использовать тест-набор для ПЦР в реальном времени, предложенный Ходжеттсом с соавт. для гена 23S рРНК (Hodgetts *et al.*, 2009):

ЈН-F 1 (прямой праймер): 5'-GGT CTC CGA ATG GGA AAA CC-3'

ЈН-F all (прямой праймер): 5'-ATT TCC GAA TGG GGC AAC C-3'

ЈН-R (обратный праймер): 5'-CTC GTC ACT ACT ACC RGA ATC GTT ATT AC-3'

ЈН-P uni (зонд TaqMan): 5'-FAM-MGB-AAC TGA AAT ATC TAA GTA AC-BHQ-3'

Реакционная смесь (25 мкл): 1× основная смесь TaqMan для ПЦР в реальном времени, 300 нМ прямого праймера, 300 нМ обратного праймера, 100 нМ зонда FAM и 2 мкл ДНК-матрицы. Все образцы тестируют дважды. Условия амплификации: начальный этап денатурации 3 мин при 95 °С; 40 циклов по 15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С. Эти условия могут варьироваться в зависимости от типа используемой основной смеси. Так, например, некоторые смеси требуют включения этапа активации полимеразы при 95 °С в течение 10 мин, а смеси, содержащие урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ), требуют предварительной инкубации при 50 °С в течение 2 мин. Результаты ПЦР в реальном времени анализируют с помощью компьютерной программы, прилагаемой к инструменту.

В тест-системе ПЦР в реальном времени, предложенной Кристенсеном с соавт. (Christensen *et al.*, 2004), используется 900 нМ обратного праймера; в более поздней работе (Christensen *et al.*, 2013) это количество было заменено на 300 нМ. Данная тест-система одинаково хорошо работает с любыми из двух вышеуказанных концентраций обратного праймера.

Метод исследования 16S рРНК с помощью ПЦР в реальном времени был оценен путем тестирования фитоплазм из 18 подгрупп. По результатам оценки, этот метод продемонстрировал такую же или более высокую чувствительность (вплоть до десятикратного превышения) по сравнению со стандартной вложенной ПЦР, в зависимости от комбинации "хозяин-фитоплазма" (Christensen *et al.*, 2004). Результаты сравнительного исследования методик выявления фитоплазм в фруктовых деревьях с участием 22 лабораторий (ринг-тест) показали, что тест-системы Кристенсена с соавт. (Christensen *et al.*, 2004) и Ходжеттса с соавт. (Hodgetts *et al.*, 2009) обладают одинаковой чувствительностью и специфичностью (EUPHRESO FruitPhytoInterlab Group, 2011).

Наличие ПЦР-компетентной ДНК в экстрактах подтверждается с помощью теста СОХ, предложенного Веллером с соавт. (Weller *et al.*, 2000), в котором происходит амплификация гена цитохромоксидазы:

СОХ-F (прямой праймер): 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

СОХ-R (обратный праймер): 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'

СОХ-P (зонд TaqMan): 5'-FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-BHQ-3'

В качестве альтернативы, рекомендуемой для однодольных растений, для которых тест СОХ менее эффективен, в целях подтверждения ПЦР-компетентности ДНК можно использовать тест Кристенсена с соавт. (Christensen *et al.*, 2004) для гена 18S рРНК:

Прямой праймер: 5'-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3'

Обратный праймер: 5'-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3'

Зонд TaqMan: 5'-FAM-ACA CAC CGC CCG TCG CTC C-BHQ-3'

Реакционные смеси для тестов на гены COX и 18S рРНК имеют одинаковый состав и обрабатываются при тех же условиях, что и при тесте на фитоплазмы в реальном времени, так что оба теста можно проводить одновременно в отдельных пробирках. В качестве альтернативы можно мультиплицировать тест внутреннего контроля в той же пробирке, которая используется для теста на фитоплазмы, при условии маркировки зонда другим сигнальным красителем и оптимизации концентраций праймера и зонда, так чтобы предотвратить конкурентное вытеснение низких уровней фитоплазмы за счет высоких уровней растительной ДНК, используемой в качестве внутреннего контроля.

3.3 Контроли молекулярных анализов

Чтобы результат анализа считался надежным, каждая серия выделения нуклеиновых кислот и амплификации нуклеиновой кислоты организма-мишени должна сопровождаться постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. Для ПЦР положительный контроль нуклеиновой кислоты, внутренний контроль и отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы) являются тем минимумом, который следует использовать.

Положительный контроль нуклеиновой кислоты. Данный контроль предназначен для отслеживания эффективности аналитического метода (помимо экстракции) и, в частности, процесса амплификации. В этих целях можно использовать ДНК, выделенную из зараженного растения, ДНК после полногеномной амплификации или синтетический контроль (например, клонированный продукт ПЦР).

Внутренний контроль. Как для стандартной ПЦР, так и для ПЦР в реальном времени конститутивный ген ("ген домашнего хозяйства") растения, такой как эукариотный ген 28S рРНК или ген COX (см. раздел 3.2, где приведено описание его использования в стандартной вложенной ПЦР) следует включать в протокол, чтобы исключить возможность ложно отрицательных результатов в связи с неудачей при экстракции нуклеиновой кислоты, из-за ее деградации или вследствие наличия ингибиторов ПЦР.

Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы). Данный контроль необходим для стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Для этого на этапе амплификации добавляют воду для ПЦР, которую использовали при подготовке реакционной смеси.

Положительный контроль выделения. Данный контроль используется для подтверждения того, что нуклеиновая кислота фитоплазмы выделена в достаточном количестве и достаточного качества для ПЦР и что организм-мишень обнаружен. ДНК фитоплазмы выделяют из ткани инфицированного растения-хозяина или из ткани здорового растения, в которую внесли фитоплазмы.

Положительный контроль составляет примерно 1/10 от количества ткани листьев каждого растения, использованного для выделения ДНК. Если образцы объединяют в сборную пробу, количество положительного контроля следует соответственно корректировать (например, 10 серий образцов по 20 мг, объединенных для выделения ДНК, 2 мг инфицированных листьев + 198 мг ткани здорового растения). Если положительный контроль не выявляется, анализ повторяют либо уменьшают норму объединения до тех пор, пока не будет достигнуто достоверное выделение.

В ходе ПЦР следует принять меры, направленные на предотвращение перекрестной контаминации, вызванной аэрозолями от положительного контроля или от положительных образцов. Исползованный в лаборатории контроль следует секвенировать, так чтобы полученную последовательность можно было легко сравнить с последовательностью, полученной от ПЦР-ампликонов нужного размера. Другим способом является изготовление синтетических положительных контролей с известной последовательностью, которую также можно сравнить с ПЦР-ампликонами нужного размера.

Отрицательный контроль выделения. Этот контроль используют для отслеживания контаминации во время выделения нуклеиновых кислот и/или перекрестного взаимодействия с тканью растения-хозяина. В качестве контроля можно использовать экстракционный буфер или нуклеиновую кислоту, выделенную из неинфицированной ткани растения-хозяина и затем амплифицированную. В тех случаях, когда ожидается значительное число положительных образцов, рекомендуется включать отрицательные контроли выделения между образцами для анализа.

3.4 Интерпретация результатов ПЦР

3.4.1 Стандартная вложенная ПЦР

Патоген-специфичная ПЦР считается достоверной только при наличии следующих условий:

- положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты производит ампликон правильного размера для патогена-мишени;
- отрицательный контроль выделения и отрицательный контроль амплификации не продуцируют ампликонов правильного размера для патогена-мишени.

Что касается внутренних контролей для ДНК-мишени растения, то здоровый контроль (если используется), положительный контроль и каждый из тестируемых образцов должны производить ампликон ожидаемого размера. Если образцы не приводят к амплификации с праймерами внутреннего контроля, это может свидетельствовать, например, о том, что выделение ДНК не удалось, что нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, что в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, подавляющие ПЦР, либо что ДНК деградировала.

Тест образца считается положительным, если он производит ампликон правильного размера. Для идентификации фитоплазмы, присутствующей в положительных образцах, ампликон необходимо секвенировать (см. раздел 3.5). Для некоторых ситуаций имеются более специфичные тест-системы ПЦР.

3.4.2 ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени позволяет определить, является ли образец положительным или отрицательным на наличие фитоплазм. Для идентификации фитоплазм, присутствующих в положительных образцах, потребуется провести стандартную ПЦР с получением гена 16S рРНК длиной не менее 1250 п. н., сгенерированного из пары праймеров R16F2p/R16R2 для последующего секвенирования (см. раздел 3.5). В качестве альтернативы для некоторых фитоплазм можно использовать специфичные тест-системы ПЦР в реальном времени, например для группы 16SrX (пролиферация яблони) (Torres *et al.*, 2005) и золотистого пожелтения винограда (*flavescence dorée*) (Pelletier *et al.*, 2009).

3.5 Секвенирование

Продукты ПЦР следует секвенировать: либо непосредственно, либо предварительно клонируя с применением клонирующего вектора ПЦР. Результаты секвенирования можно анализировать с помощью программы логического сравнения аминокислотных и нуклеотидных последовательностей Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN), имеющейся в Национальном информационном центре по биотехнологии (США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Если

последовательность менее чем на 97,5% совпадает в сравнении с ближайшим гомологом, то изучаемую фитоплазму относят к новому виду '*Ca. Phytoplasma*'. В таком случае необходимо секвенировать всю совокупность гена 16S рРНК с последующим проведением филогенетического анализа. Желательно также отдельно секвенировать другой участок генома, например спейсер 16S/23S рРНК, ген *secY*, гены рибосомных белков или ген *tuf*.

4. Данные

Данные и доказательства необходимо хранить в соответствии с положениями МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут затрагивать интересы других договаривающихся сторон, в особенности при выявленных несоответствиях, а также если фитоплазма обнаружена на данной территории впервые, следует не менее года хранить с соблюдением отслеживаемости нижеперечисленные данные, доказательства и дополнительные материалы:

- Оригинальный образец в замороженном виде при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ либо после лиофильной сушки или обычной сушки в присутствии хлорида кальция при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Если применимо, продукты экстракции ДНК следует хранить при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Растительные вытяжки, нанесенные на мембраны, следует хранить при комнатной температуре.
- Если применимо, продукты ПЦР-амплификации следует хранить при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Контактные адреса для дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить, обратившись в следующие учреждения:

Лаборатория здоровья растений и окружающей среды, Министерство сырьевой промышленности, Окленд, Новая Зеландия (Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, PO Box 2095, Auckland 1140, New Zealand (Lia W. Lieferting; эл. почта: lia.lieferting@mpi.govt.nz; тел.: +64 9 9095726; факс: +64 9 9095739).

Департамент экономического развития, трудовой занятости, транспорта и ресурсов, Виктория, Австралия (Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Victoria, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, VIC 3083, Australia (Fiona Constable; эл. почта: fiona.constable@ecodev.vic.gov.au; тел.: +61 3 9032 7326; факс: + 61 3 9032 7604).

Департамент территорий и устойчивости, Барселона, Испания (Department of Territory and Sustainability, Av. Diagonal 525, 08029 Barcelona, Spain (Ester Torres; эл. почта: ester.torres@gencat.net).

Федеральный центр биологических исследований в сельском и лесном хозяйстве, Институт защиты растений и плодовых культур, Доссенхайм, Германия (Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute for Plant Protection and Fruit Crops, Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim, Germany (Wilhelm Jelkmann; эл. почта: wilhelm.jelkmann@jki.bund.de).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП).

6. Благодарности

Составители настоящего диагностического протокола: Л. У. Лифтинг, Лаборатория здоровья растений и окружающей среды, Министерство сырьевой промышленности, Новая Зеландия (см. предыдущий раздел); П. Джоунз, Отдел фитопатогенных взаимодействий, Научно-исследовательский центр Ротамстед, Соединенное Королевство; Ф. Констэбл, Департамент экономического развития, трудовой занятости, транспорта и ресурсов, Виктория, Австралия (см. предыдущий раздел); Е. Торрес, Департамент территорий и устойчивости, Барселона, Испания (см. предыдущий раздел); В. Йелкманн, Федеральный центр биологических исследований в сельском и лесном хозяйстве, Институт защиты растений и плодовых культур, Германия (см. предыдущий раздел); Й. Верхувен, Служба защиты растений, Отдел диагностики, Вагенинген, Нидерланды.

7. Справочные материалы

Настоящее приложение относится к международным стандартам по фитосанитарным мерам (МСФМ). МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП): <https://www.ippc.int/ru/core-activities/standards-setting/ispms>.

- Ahrens, U. & Seemüller, E.** 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. & Boudon-Padieu, E.** 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. & Hogenhout, S.A.** 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E.** 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145–1152.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schulz, A.** 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175–1184.
- Christensen, N.M., Nyskjold, H. & Nicolaisen, M.** 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 245–252. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Constable, F.E., Gibb, K.S. & Symons, R.H.** 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276.
- Daire, X.D., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E.** 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.
- Davis, R.E., Jomantiene, R. & Zhao, Y.** 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832–840.
- Davis, R.E. & Sinclair, W.A.** 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.
- Davis, R.E., Zhao, Y., Dally, E.L., Lee, I.M., Jomantiene, R. & Douglas S.M.** 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766–776.

- Deng, S. & Hiruki, C.** 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.
- Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Mycoplasma or PLT-group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows and paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266.
- EUPHRESCO FruitPhytoInterlab Group.** 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma prunorum' and 'Candidatus Phytoplasma pyri': Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281–S284.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. & Marzachi, C.** 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353–1375.
- Foissac, X. & Wilson, M.R.** 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In P.G. Weintraub & P. Jones, eds. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, pp. 309–324. Wallingford, UK, CABI. 331 pp.
- Fránová, J.** 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287–S288.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A. & Batlle, A.** 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513–520.
- Green, M.J., Thompson, D.A. & MacKenzie, D.J.** 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482–485.
- Gundersen, D.E. & Lee, I-M.** 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.
- Guo, Y.H., Cheng, Z.M. & Walla, J.A.** 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134–1136.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. & Dickenson, M.** 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.
- IPWG (International Phytoplasma Working Group).** n.d. Phytoplasma collection web page. Available at http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5 (last accessed 17 April 2015).
- IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group).** 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.
- Ishie, T., Doi, Y., Yora, K. & Asuyama, H.** 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267–275.
- Jarausch, W., Lancas, M. & Dosba, F.** 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47–54.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J. & Dally, E.** 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269–277.
- Kirkpatrick, B.C.** 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-S. Schleifer, eds. *The prokaryotes*, Vol. III, pp. 4050–4067. New York, NY, Springer Verlag.

- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. & Purcell, A.H.** 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197–199.
- Kreader, C.A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102–1106.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E. & Harrison, N.A.** 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887–2897.
- Lee, I.-M., Davis, R.E. & Gundersen-Rindal, D.E.** 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. & Bartoszyk, I.M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E.** 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.
- Lim, P.-O. & Sears, B.B.** 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606–2611.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A. & Nicolaisen, M.** 2012. DNA barcoding for identification of ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PloS ONE*, 7: e52092.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. & Seemüller, E.** 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805–810.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. & Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037–2051.
- Marzachi, C.** 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228–231.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rupar, M., Boben, J., Ravnikar, M. & Dermastia, M.** 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: M. Dickinson & J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 139–145. New York, NY, Humana Press. 421 pp.
- Necas, T. & Krska, B.** 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101–105.
- Oshima, K., Maejima, K. & Namba, S.** 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2013.00230.
- Palmano, S.** 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99–107.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. & Malembic-Maher, S.** 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.
- Pilotti, C.A., Saul, J., Liefing, L.W., Kembu, A. & Kokoa, P.** 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32–40.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M. & Dermastia, M.** 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760–766.
- Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.-M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R. & Barba, M.** 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs)

- associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130–1137.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., Wei, W. & Davis, R.E.** 2013. 'Candidatus *Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2879–2894.
- Schneider, B., Gibb, K.S. & Seemüller, E.** 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C.** 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In S. Razin & J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Vol. 1, pp. 369–380. San Diego, CA, Academic Press. 483 pp.
- Seemüller, E., Garnier, M. & Schneider, B.** 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In S. Razin & R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, pp. 91–115. New York, NY, Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 pp.
- Seemüller, E., Schaper, U. & Zimbelmann, F.** 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382 (in English with German summary).
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C. & Martin, M.P.** 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334–340.
- Weintraub, P. & Beanland, L.** 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.
- Werren, J.H., Windsor, D. & Guo, L.** 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.
- Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K. & Kirkpatrick, B.C.** 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45–50.

История публикации

Не является официальной частью стандарта

2004-11 КС добавил тему: Вирусы и фитоплазмы (2004-018).

2006-04 КФМ-1 добавила тему.

2013-04 Экспертная консультация.

2013-06 Проект представлен на сессии ТГЭДП.

2014-05: КС одобрил текст для проведения консультации с членами (2014_eSC_May_07).

2014-07 Консультация с членами.

2015-03 ТГЭДП одобрила текст для передачи в КС для одобрения к принятию (2015_eTPDP_May_01).

2015-06: КС утвердил период нотификации проекта протокола (2015_eSC_Nov_11).

2015-08 Период нотификации по ДП.

2015-08 Получено формальное возражение.

2015-09 Виртуальное заседание ТГЭДП.

2015-10 ТГЭДП провела анализ формального возражения (2015_eTPDP_Oct_03).

2015-11: КС утвердил период нотификации проекта протокола и ответ на формальное возражение (2015_eSC_Nov_10).

2016-01: КС утвердил ДП от лица КФМ (формальных возражений не высказывалось).

МСФМ 27. Приложение 12. Фитоплазмы (2016). Рим, МККЗР, ФАО.

История публикации последний раз обновлена: 2016-04