

**СЕКЦИЯ 4. БИОЛОГИЗИРОВАННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЗАЩИТЫ  
РАСТЕНИЙ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ФИТОСАНИТАРНОГО И  
ПРОДУКЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА МНОГОЛЕТНИХ  
АГРОЦЕНОЗОВ**

УДК 634.711:632

DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-130-132

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ  
ДИАГНОСТИКЕ ФИТОПЛАЗМЫ МАЛИНЫ**

**Божидай Т.Н., канд. биол. наук**

*Республиканское научно-производственное дочернее унитарное предприятие «Институт  
плодоводства» (Самохваловичи, Беларусь)*

**Реферат.** Приведены результаты ПЦР в реальном времени с серией десятикратных разведений образцов ДНК, выделенных из различных частей растений малины, пораженных фитоплазмой.

**Ключевые слова:** малина, фитоплазма, ДНК, ПЦР, Беларусь

**Summary.** The results of real-time PCR with a series of ten-fold dilutions of DNA samples isolated from various parts of raspberry plants infected with phytoplasma are presented.

**Key words:** raspberry, phytoplasma, DNA, PCR, Belarus

**Введение.** Израстание малины (*Candidatus Phytoplasma rubi*) – экономически важное заболевание, характерный симптом – образование массы адвентивных почек на корнях, из которых в виде пучков развивается большое количество тонких побегов, которые значительно короче здоровых (при сильном поражении длина их может составлять всего 10–15 см) [1].

Основным методом выявления фитоплазмы является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [2-5]. В процессе разработки протокола лабораторной диагностики фитоплазм для различных ягодных культур и проведении генетических исследований фитоплазм, установлено значительное количество ложноотрицательных результатов ПЦР анализа в реальном времени. Анализ причин возникновения ложноотрицательных результатов, показал наличие ингибиторов амплификации при высоких количествах генетического материала в растворах, состоящих из тотальной ДНК растения и фитоплазмы.

В связи с вышеизложенным, оказалось необходимым проведение исследований по определению чувствительности ПЦР в реальном времени при диагностике фитоплазмы малины и минимизации влияния тканей растения-хозяина в пробе для диагностики.

Цель исследования – определение чувствительности ПЦР в реальном времени при диагностике фитоплазмы малины.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» 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 ягодных культур.

Материалом для исследования служили корни, почки и листья растений малины (таб. 1).

Таблица 1 – Образцы малины, используемые для определения чувствительности ПЦР

№ образца	Тип образца	Период отбора образца	Концентрация, нг/мкл
1	лист	июнь	59,85
4	корень	июнь	1,15
8	почки	сентябрь	289,20
10	корень	сентябрь	30,0
14	почки	сентябрь	175,25
16	корень	сентябрь	141,70
33	почки	июнь	45,85
34	корень	июнь	2,50

ДНК выделяли коммерческим набором реактивов GenJET Plants Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Литва), используя 100 мг растительного материала. Измерение концентрации ДНК в полученном растворе проводили с помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Implen, Германия).

Выделенную ДНК использовали для ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом:

- Phyto-F – CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA;
- Phyto-R – TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA;
- Phyto-P – FAM-TGACGGGACTCCGCACAAGCG-BHQ-1 [5].

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

Температурно-временные параметры амплификации: предварительная денатурация при 95 °С (2 мин); 45 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С (5 с), отжига праймеров при 60 °С (30 с), элонгации при 67 °С (15 с).

Результаты ПЦР в реальном времени анализировали с помощью компьютерной программы CFX Manager™ Software, прилагаемой к прибору.

**Обсуждение результатов.** Как показали результаты ПЦР в реальном времени с серией десятикратных разведений образцов ДНК, выделенных из различных частей малины, чувствительность реакции была высокой – значения пороговых циклов детектировали и при разведении 1:10000 (табл. 2).

Отрицательные контроли в опытах не давали показаний C<sub>q</sub>.

При использовании в реакции исходной ДНК без разведения наличие фитоплазмы в образцах номер 4, 14, 16 и 34 детектировали при значениях циклов в пределах 13,73–20,01 (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты ПЦР диагностики фитоплазмы с серией десятикратных разведений образцов ДНК

№ образца	Тип образца	Пороговое значение цикла, C <sub>q</sub>				
		исходная ДНК	разведение ДНК			
			1:10	1:100	1:1000	1:10000
1	лист	–	27,24	31,02	34,88	37,55
4	корень	20,01	23,53	27,01	30,23	33,26
8	почки	43,34	24,74	28,06	31,09	33,06
10	корень	–	21,84	25,24	28,21	31,29
14	почки	17,19	20,93	24,24	27,73	31,40
16	корень	13,73	16,19	19,45	22,80	25,27
33	почки	–	19,91	23,50	27,07	30,11
34	корень	18,31	21,57	24,64	28,33	31,27

Примечание: «–» – отсутствие значений пороговых циклов ( $C_q \geq 45$  цикла).

Образец номер 8 был зафиксирован уже только после 40 цикла. Для образцов номер 1, 10 и 33 не детектировали значения пороговых циклов ( $C_q \geq 45$  цикла), что является ложноотрицательным результатом. Это связано с тем, что зачастую образцы ДНК содержат ингибиторы, замедляющие или ингибирующие амплификацию.

Разведение исходной ДНК позволило детектировать наличие фитоплазмы во всех изучаемых образцах. При максимальном разведении значения пороговых циклов флуоресценции составили от 25,27 до 37,55 (табл. 2).

**Выводы.** Результаты ПЦР в реальном времени с серией десятикратных разведений образцов ДНК, выделенных из различных частей растения, показали, что чувствительность реакции была высокой – значения пороговых циклов детектировали и при разведении 1:10000. Также разведение исходной ДНК позволило детектировать наличие фитоплазмы во всех изучаемых образцах и исключить получение ложноотрицательных результатов.

### Литература

1. Кухарчик Н.В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси. Минск: Беларуская навука, 2012. 209 с.
2. Cieslinska M. Detection and characterization of phytoplasmas associated with diseases of *Rubus* spp. in Poland // Journal of Plant Pathology. 2011. Vol. 93(1). P. 51-56.
3. Gundersen D.E., Lee I.M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs // Phytopathologia Mediterranea. 1996. Vol. 35. P. 144-151.
4. 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. P. 728-735. DOI:10.1094/PHYTO-85-728
5. 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, № 11. P. 1175-1184. DOI: 10.1094/MPMI.2004.17.11.1175