

ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФИТОПЛАЗМОЗОВ ВИНОГРАДА

Г.Н. Матяшова^{1,2}, В.Г. Заец¹

¹Агробиотехнологический департамент
Аграрно-технологический институт
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
*ул. Пограничная, 32, пос. Быково, Раменский р-н,
Московская обл., Россия, 140150*

Для выявления и идентификации *Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree* — возбудителя золотистого пожелтения винограда, карантинного вредного организма для территории России, и *Candidatus Phytoplasma solani Bois noir* — возбудителя почернения коры винограда был применен один из существующих методов диагностики ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). Подобранные на участок 16SrRNA гена видоспецифичные праймерные системы исследовали на наличие ложноположительных и ложноотрицательных результатов для обнаружения в растительном материале двух вышеуказанных возбудителей фитоплазмозов. По результатам ПЦР в режиме «реального времени» было определено, что изучаемые пары праймеров позволяют выявлять целевые виды фитоплазм. Перекрестные реакции с другими видами фитоплазм не были зафиксированы. Пары праймеров не дают ложноположительных реакций с грамположительными бактериями и некоторыми видами бактерий микрофлоры винограда. Пары праймеров и соответствующие зонды FDrtF/R/FAM и BNrtF/R/FAM возможно использовать для обнаружения и идентификации фитоплазм — возбудителей болезней FD и BN в подкарантинном материале, а также при проведении мониторингов. Метод ПЦР-РВ считается достаточно простым в исполнении и не требует больших затрат времени для детекции результатов.

Ключевые слова: диагностика, фитоплазмы, карантин растений, ПЦР.

Фитоплазмы являются возбудителями болезней многих плодовых, ягодных культур, в том числе винограда *Vitis vinifera*. Болезни виноградной лозы объединяют в одну группу — пожелтения винограда (Grapevine yellows, GY), в которую входят фитоплазмы, принадлежащие к разным видам. Одними из представителей данной группы являются фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree* (FD) и *Candidatus Phytoplasma solani Bois noir* (BN). Распространение группы

пожелтения винограда в мире связано непосредственно с районами возделывания виноградников и ареалом обитания насекомых-переносчиков [5].

В 1990-х гг. симптомы фитоплазмозов винограда впервые были зарегистрированы в Европе во Франции, затем в Италии и Сербии. Фитоплазмы *Ca. Phytoplasma vitis* и *Ca. Phytoplasma solani* относятся к разным таксономическим подгруппам — *Elm Yellow group* и *Stolbur group* соответственно [3]. Эти фитоплазмы вызывают одинаковый комплекс симптомов, однако *Ca. Phytoplasma vitis* в течение 20-ти лет является карантинным объектом в списках европейских стран из-за более высокой вредоносности, чем у *Ca. phytoplasmasolani* [8]. Иногда обе фитоплазмы поражают виноградники вместе. Растущий ущерб и увеличение территории распространения в Европе ставят задачу разработки мер борьбы с инфекцией, а также методов точной идентификации и дифференциации от других возбудителей фитоплазмозов для своевременного обнаружения новых очагов и сокращения прежних [1].

Как известно, фитоплазмы передаются с растения на растение через насекомых-переносчиков. Инфекция может сохраняться в растениях-резерваторах. Чаще всего ими являются сорные растения, произрастающие в зонах возделывания виноградников. В результате проведенных экспериментов было установлено, что переносчиком возбудителя золотистого пожелтения винограда является цикадка *Scaphoideus titanus* (Ball, 1932), которая была завезена из Северной Америки. Вид *Scaphoideus titanus* на территории России распространен ограниченно [4]. Переносчик фитоплазм группы *Stolbur*, в том числе возбудителя почернения коры винограда, — цикадка вьюнковая *Nyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) [6]. Цикадки распространены в Европе (Германия, Словения, Греция, Италия, Франция, Португалия, Сербия, Кипр, Швейцария), в Азии (Казахстан, Узбекистан, Сирия, Ирак), в Северной Африке (Тунис, Марокко) и южных регионах России. Так как насекомые предпочитают мягкий и теплый климат, в России *Nyalesthes obsoletus* обитает в южных регионах (Краснодарский край, республики Северного Кавказа, Ставропольский край). *N. obsoletus* питается на многих культурных (картофель, томат, баклажан, виноград) и сорных (вьюнок, крапива, бодяг) растениях [9].

Показано, что некоторые разработанные генетические маркеры для диагностики фитоплазм дают ложноположительные результаты, которые можно выявить лишь с помощью расшифровки нуклеотидных последовательностей (секвенированием), так как в таком случае RFLP-анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) не детектирует видоспецифичные фрагменты. В отношении ложноотрицательных реакций одной из проблем идентификации FD является то, что появляются новые генетические штаммы возбудителя в короткий промежуток времени, и старые методы диагностики уже не работают для их идентификации, а также идентификации других фитоплазм, связанных с пожелтением винограда. Для разработки приемлемых методов в молекулярных исследованиях используют консервативные участки генов, по которым удалось провести классификацию фитоплазм, а также дифференцировать штаммы некоторых видов возбудителя болезни [7].

Основной целью работы было исследование специфических праймерных систем и зондов, разработанные на участок 16S гена возбудителей фитоплазмозов винограда для дифференциации карантинного вида фитоплазмы FD от не каран-

тинного вида BN, а также других фитоплазм. Одной из поставленных задач являлось исследование генетических маркеров на предмет ложноположительных и ложноотрицательных результатов, которые необходимо исключить в проведении фитосанитарного анализа подкарантинной продукции и мониторингов виноградников на территории России.

Материалы и методы. Исследовали праймерные системы и зонды, предложенные для идентификации возбудителей фитоплазмозов винограда FD и BN [2]. Проводили амплификации в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) выделенной из растений винограда ДНК целевых фитоплазм. Для изучения ложноположительных результатов в опытах методом ПЦР-РВ использовали образцы ДНК грамположительных (*Xanthomonas pruni*, *Erwinia perfoliana*, *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas fragaria*) и граммотрицательных (*Periostococcus pentosaceus*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella confusa*) бактерий, некоторых бактерий рода *Pseudomonas* и *Micrococcus* микрофлоры винограда, а также ДНК, полученную из неинфицированного растительного материала винограда разного территориального происхождения (Россия, Италия, Франция).

Для определения уровня специфичности обеих пар праймеров и соответственных им зондов проводили ПЦР-РВ с образцами ДНК различных видов фитоплазм некоторых таксономических групп, выделенными из инфицированных растений с установленной видовой принадлежностью: *Ca. Ph. rubi*, *Ca. Ph. solani*, *Ca. Ph. taraxacum*, *Ca. Ph. cactus*, *Ca. Ph. pyri*, *Ca. Ph. helianthus*, *Ca. Ph. beta leaf*, *Ca. Ph. apricot*, *Ca. Ph. asteris* (табл. 1).

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность 3'-5'	Автор
FDrtF	AAG TCG AAC GGA GAC CCT TC	Angelini et al., 2006
FDrt R	TAG CAA CCG TTT CCG ATT GT	
FD-FAM	AAA AGG TCT TAG TGG CGA ACG GGT	
BNrt F	GGT TAA GTC CCG CAA CGAG	
BNrt R	CCC ACC TTC CTC CAA TTT ATCA	
BN-FAM	AAC CCT TGT TGT TAA TTG CCA TCA TTA AG	

Для проведения реакций использовали готовый мастермикс из компонентов для ПЦР-анализа «qPCRmix-NS», включая ПЦР в режиме «реального времени» («Евроген», Россия). После оптимизации реакционная смесь включала в себя 5 мкл мастермикса, по 0,75 мкл каждого праймера и зонда, 2,5 мкл ДНК и 15,25 мкл H₂O для доведения до общего объема в 25 мкл. Температурно-временные условия прохождения одинаковы для обеих пар праймеров, и после ряда оптимизаций были следующими: предварительная денатурация — 95 °С, денатурация 95 °С — 15 минут, элонгация 59 °С — 1 минута 30 секунд. Амплификации составляли 45 циклов. Дополнительно в режим был включен прогрев 50 °С на 2 минуты, что заявлено в инструкции амплификатора для ПЦР-РВ StepOnePlus («Applied-biosystems», США).

Результаты и обсуждения. По результатам исследования были сделаны следующие выводы. Анализ ПЦР в «реальном времени» с образцами ДНК здорового

винограда, грамположительных и грамотрицательных бактерий не зафиксировал значения циклов, что говорит об отсутствии с ними ложноположительных результатов (табл. 2). Две культуры микроорганизмов, выделенных в чистую культуру из экстрактов листьев, показали циклы в пределах 39,14—40,55. Этими значениями можно пренебречь, так как пороговым положительным является 36-й цикл ПЦР-РВ.

Таблица 2

Постановка опыта для исследования ложноположительных результатов с видоспецифическими праймерами FDrtF/R и зондом FD-FAM

№	Шифр	Результаты ПЦР-РТ				Объект	Происхождение
		Ct 1 повт.	Ct 2 повт.	Ct 3 повт.	Среднее значение Ct		
1	2	N/A	N/A	N/A	N/A	ДНК, выделенная из растений винограда при проведении внутренних и предотгрузочных мониторингов и экспертизы на наличие фитоплазм	Дагестан 2011
2	12	N/A	N/A	N/A	N/A		
3	13	N/A	N/A	N/A	N/A		
4	16	N/A	N/A	N/A	N/A		
5	1	N/A	42.06	N/A	N/A		Франция 2015
6	8	39.9	N/A	N/A	N/A		
7	15	N/A	N/A	N/A	N/A		
8	22	N/A	N/A	N/A	N/A		Крым 2014
9	2	N/A	N/A	N/A	N/A		
10	4	N/A	39.17	N/A	N/A		
11	6	N/A	N/A	N/A	N/A		
12	8	38.9	N/A	N/A	N/A		Италия 2013
13	1ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
14	6 ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
15	5ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
16	2ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
17	P. p	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Pepiococcus pentosaceus</i>	Образцы ДНК Г+бактерий (коллекция штаммов Приходько С.И.), 2012—2014
18	L. lac	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Leuconostoc lactis</i>	
19	L. mes	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Образцы ДНК Г-бактерий из коллекций ФГБУ «ВНИИКР», 2010—2014
20	W. com	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Weisella confuse</i>	
21	X. pr	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Xanthomonas pruni</i>	
22	E. pfn	N/A	39.43	N/A	N/A	<i>Erwinia perfoliana</i>	
23	P. agl	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Pantoea agglomerans</i>	
24	X. frag	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Xanthomonas fragaria</i>	
25	3\1-5p	40.0	N/A	N/A	N/A	ДНК бактерий родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Micrococcus</i>	Образцы микрофлоры винограда (Матяшова Г.Н.)
26	9\1-3p	N/A	N/A	N/A	N/A		
27	2\4-7m	39.5	38.78	N/A	39,14		
28	2\4-6m	39.7	41.40	N/A	40,55	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Дагестан 2011
29	BN-D	37.9	36.75	40,70	38,45		
30	BN-F	36.4	N/A	N/A	N/A	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Франция 2012
31	FD	14.5	15.31	15,81	15,20	<i>Ca. Ph. vitis</i> FD	Франция 2012
32	FD	15.0	15.20	15,82	15,34	<i>Ca. Ph. vitis</i> FD	Франция 2012
33	K-1	N/A	N/A	N/A	N/A	K-	K-чистый
34	K-2	38.4	N/A	N/A	N/A	K-	K-проб

В свою очередь, образец ДНК возбудителя почернения коры винограда *Ca. Ph. solani* BN (№ 29, табл. 2) был в среднем зафиксирован с показанием 38,45 цикла, что также не является положительным результатом, хотя может служить подозре-

нием на заражение карантинным видом возбудителя фитоплазмоза, присутствующим в очень низких концентрациях в тканях образца винограда.

Положительные контроли — образцы ДНК возбудителя золотистого пожелтения винограда сработали с данной парой праймеров в пределах от 15,20 до 15,34 циклов. Опыт показал, что метод ЦПР-РВ, разработанный для видовой идентификации *Ca. Phytoplasma vitis* FD, позволяет дифференцировать карантинный объект от грамположительных, грамотрицательных бактерий и организмов микрофлоры винограда, а также от возбудителя почернения коры винограда, поражающего то же растение-хозяина.

Таблица 3

Результаты ПЦР-РВ праймеров FDrfF/R и зонда FD-FAM с образцами ДНК некоторых видов фитоплазм

№	Шифр	Объект	Происхождение	Значения циклов ПЦР-РТ, Ct			
				Повторности эксперимента			Среднее значение
1	RS	<i>Ca. Ph. rubi</i>	Россия, 2012	27,76	30,75	25,53	28,01
2	FD	<i>Ca. Ph. vitis</i>	Франция, 2012	15,54	15,22	15,23	15,33
3	STOL	<i>Ca. Ph. solani</i> STOL	Россия, 2013	N/A	N/A	N/A	N/A
4	AY	<i>Ca. Ph. asteris</i>	Россия, 2013	40,14	40,69	39,26	40,03
5	CacP	<i>Ca. Ph. cactus</i>	Россия, 2014	40,61	43,21	39,64	41,15
6	TP	<i>Ca. Ph. taraxacum</i>	Россия, 2014	N/A	N/A	39,08	N/A
7	CP	<i>Ca. Ph. pyri</i>	Россия, 2013	N/A	41,29	39,90	40,60
8	BN-D	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Россия, 2011	42,16	N/A	N/A	N/A
9	BN-F	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Франция, 2012	39,93	44,57	38,34	40,9
10	HP	<i>Ca. Ph. helianthus</i>	Россия, 2014	N/A	N/A	N/A	N/A
11	BP	<i>Ca. Ph. beta leaf</i>	Россия, 2014	N/A	N/A	N/A	N/A
12	AprP	<i>Ca. Ph. apricot</i>	Чехия, 2012	N/A	43,4	40,62	42,01
13	K-cl	Отриц. Контр. 1	—	N/A	N/A	N/A	N/A
14	K-p	Отриц. Контр. 2	—	N/A	N/A	N/A	N/A

При проведении исследования на видовую специфичность праймеров было установлено, что визуализация графиков амплификации некоторых видов фитоплазм (AY, CacP, AprP, CP, BN-F) показала максимальное нарастание флуоресценции на циклах в диапазоне от 40,03 до 42,01. Полученные пороговые значения можно отнести к отрицательным, так как они находятся ниже отметки 36-го цикла.

Образец ДНК *Ca. Ph. rubi* (далее — RS) детектировали в среднем на уровне 28,01 цикла (№ 1, табл. 3). Этот результат считается положительным. Возможно, это связано с тем, что возбудитель фитоплазмоза малины RS входит в ту же таксономическую группу (Elm Yellows), что и золотистое пожелтение винограда *Ca. Phytoplasma vitis* Flavescence doree (далее — FD). В свою очередь, пик нарастания флуоресценции контрольного положительного образца ДНК фитоплазмы произошел на 15,33 цикле ПЦР-РВ. Это значение гораздо выше показаний циклов образца ДНК RS. Разработанный метод с применением вышеуказанной праймерной системы может быть использован для дифференциации группы Elm Yellows, к которой относится вид FD, от других групп, включающих в себя такого возбудителя фитоплазмоза, как *Ca. Phytoplasma solani* BN, поражающий наравне с FD виноградную лозу.

Установлено (табл. 4), что пара праймеров и зонд, разработанные для идентификации почернения коры винограда, не дает перекрестных ложноположительных и ложноотрицательных результатов с образцами ДНК винограда, грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также с ДНК возбудителя золотистого пожелтения *Ca. Ph. vitis* FD (№ 32, табл. 4) — карантинного вредного организма для территории России.

Таблица 4

Постановка опыта для исследования ложноположительных результатов с видоспецифическими праймерами BNrtF/R и зондом BN-FAM

№	Шифр	Результаты ПЦР-РТ				Объект	Происхождение
		Ct 1 повт.	Ct 2 повт.	Ct 3 повт.	Среднее значение Ct		
		N/A	N/A	N/A	N/A		
1	2	N/A	N/A	N/A	N/A	ДНК, выделенная из растений винограда при проведении внутренних и предотгрузочных мониторингов и экспертизы на наличие фитоплазм	Дагестан 2011
2	12	N/A	N/A	N/A	N/A		
3	13	N/A	N/A	N/A	N/A		
4	16	N/A	N/A	N/A	N/A		
5	1	N/A	N/A	N/A	N/A		Франция 2015
6	8	N/A	N/A	N/A	N/A		
7	15	N/A	N/A	N/A	N/A		
8	22	N/A	N/A	N/A	N/A		
9	2	N/A	N/A	N/A	N/A		Крым 2014
10	4	N/A	N/A	N/A	N/A		
11	6	N/A	N/A	N/A	N/A		
12	8	N/A	N/A	N/A	N/A		Италия 2013
13	1tp	N/A	N/A	N/A	N/A		
14	6 ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
15	5ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
16	2ltp	N/A	N/A	N/A	N/A		
17	P. p	N/A	N/A	N/A	N/A		<i>Pepiоcoccus pentosaceus</i>
18	L. lac	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Leuconostoc lactis</i>	
19	L. mes	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
20	W. com	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Weisella confusa</i>	
21	X. pr	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Xanthomonas pruni</i>	Образцы ДНК бактерий из коллекций ФГБУ «ВНИИКР»
22	E. pfn	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Erwinia perfoliata</i>	
23	P. agl	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Pantoea agglomerans</i>	
24	X. frag	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Xanthomonas fragariae</i>	
25	3\1-5p	N/A	N/A	N/A	N/A	ДНК бактерий родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Micrococcus</i>	
26	9\1-3p	N/A	N/A	N/A	N/A		
27	2\4-7m	N/A	N/A	N/A	N/A		
28	2\4-6m	N/A	N/A	N/A	N/A		
29	BN-D	29,6	26,3	25,6	27,16	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Дагестан
30	BN-F	20,5	19,9	19,6	20,0	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Франция
31	Stol	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Ca. Ph. solani</i> Stol	Московская обл.
32	FD	N/A	N/A	N/A	N/A	<i>Ca. Ph. vitis</i> FD	Франция
33	K-1	N/A	N/A	N/A	N/A	K-	K-чистый
34	K-2	N/A	N/A	N/A	N/A	K-	K-проб

Как показали результаты, праймеры и зонд достаточно специфичны при проведении амплификации с различными видами фитоплазм, принадлежащих как к одной группе с почернением коры винограда (группа Stolbur), так и других подгрупп (Elm Yellows, Aster Yellows). Значения циклов двух образцов ДНК возбу-

теля почернения коры винограда BN варьируют в пределах от 24,63 до 29,75 цикла, что удовлетворяет значения положительных результатов (табл. 5). Образец ДНК возбудителя пожелтения листьев свеклы сработал с данной парой праймеров на 36,11 цикле. Поскольку *Ca. Beta leaf phytoplasma* по некоторым литературным источникам относится к группе Stolbur, то ее можно отнести к положительным результатам, хотя показание цикла достаточно низкое и находится у границы значений, при которых результаты засчитываются отрицательными (36—45 циклы). Образец ДНК возбудителя столбура картофеля не детектируется праймерами и зондом, о чем свидетельствует отсутствие показаний циклов (N/A).

Таблица 5

Проведение ПЦР в «реальном времени» с праймерной системой BNrtF/R и зондом BN-FAM с некоторыми видами фитоплазм

№	Шифр	Объект	Происхождение, год отбора	Значения циклов ПЦР-РТ			
				Повторность опыта, Ct			Среднее Ct
1	RS	<i>Ca. Ph. rubi</i>	Россия, 2012	N/A	N/A	N/A	N/A
2	FD	<i>Ca. Ph. vitis</i>	Франция, 2012	N/A	N/A	N/A	N/A
3	STOL	<i>Ca. Ph. solani</i> STOL	Россия, 2013	N/A	N/A	N/A	N/A
4	AY	<i>Ca. Ph. asteris</i>	Россия, 2013	N/A	N/A	N/A	N/A
5	СacP	<i>Ca. cactus withes'-broom Ph.</i>	Россия, 2014	N/A	N/A	N/A	N/A
6	TP	<i>Ca. Ph. taraxacum</i>	Россия, 2014	N/A	N/A	N/A	N/A
7	CP	<i>Ca. Ph. pyri</i>	Россия, 2013	N/A	N/A	N/A	N/A
8	BN-D	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Россия, 2011	30,25	31,90	27,11	29,75
9	BN-F	<i>Ca. Ph. solani</i> BN	Франция, 2012	24,5	26,57	22,81	24,63
10	HP	<i>Ca. Ph. helianthus</i>	Россия, 2014	N/A	N/A	N/A	N/A
11	BP	<i>Ca. beta leaf Ph.</i>	Россия, 2014	38,7	N/A	33,52	36,11
12	AprCP	<i>Ca. Ph. apricot</i>	Чехия, 2012	N/A	N/A	N/A	N/A
13	K-cl	Отриц. Контр. 1	—	N/A	N/A	N/A	N/A
14	K p	Отриц. Контр.2	—	N/A	N/A	N/A	N/A

Таким образом, можно использовать разработанный метод для идентификации возбудителя почернения коры винограда в растительном материале, так как в процессе проведения исследований не было получено ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР.

Выводы.

Проведены научно-экспериментальные исследования в области диагностики фитоплазм — возбудителей болезней почернения коры винограда *Candidatus Phytoplasma solani* Bois noir (BN) группы Stolbur *Phytoplasma* Group и золотистого пожелтения винограда, карантинного вида *Candidatus Phytoplasma vitis* Flavescence doree (FD) группы Yellow's Group *Phytoplasma*.

С помощью пары праймеров FDrtF/FDrtR и зонда FD-FAM возможно дифференцировать образцы, выделенные из инфицированных растений золотистым пожелтением винограда FD от образцов, пораженных почернением коры винограда BN, а праймеры BNrtF/BNrtR и зонд BN-FAM позволят достоверно определить возбудителя почернения коры винограда BN без ложноположительных реакций с карантинным видом FD. Показано, что исследованные пары праймеров — достаточно видоспецифичные по отношению к другим видам фитоплазм, а также грамположительным, грамотрицательным бактериям и представителям микрофлоры растения винограда.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- [1] Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., et al. Multilocus Sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence doree Phytoplasma strain clusters and group 16SrV Phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe // *Applied and environmental microbiology*. 2007. P. 4001—4010.
- [2] Angelini E., Bianchi G.L., Filippin L., Morasutti C., Borgo M. A new TagMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay // *Journal of Microbiological methods*. 2007. P. 613—622.
- [3] Bertaccini A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology // *Frontiers in bioscience*. 2006. P. 673—689.
- [4] Chuche J., Thiery D. Biology and ecology of the Flavescence doree vector *Scaphoideus titanus*: a review // *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*. 2014. P. 23.
- [5] Hren M., Boben J., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. Real-time PCR detection systems for Flavescence doree and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics // *Plant Pathology*. 2007. P. 785—796.
- [6] Lessio F., Tedeschi R., Alma A. Population dynamics, host plants and infection rate with *Stolbur* phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in north-western Italy // *Plant pathology*. 2007. P. 97—102.
- [7] Pelletier C., Salar P., Gillet J., Cloquemin G., et al. 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. 2009. P. 87—95.
- [8] Petrzik K., Sarkisova T., Curnova L. Universal primers for plasmid detection and method for their relative quantification in phytoplasma-infected plants // *Bulletin of Insectology*. 2011. P. 25—26.
- [9] URL: www.vinocenter.ru.

RESEARCH OF THE REAL TIME PCR METHOD FOR DETECTION AND IDENTIFICATION PHYTOPLASMAS ON GRAPEVINE

G.N. Matyashova^{1,2}, V.G. Zaets¹

¹Agrobiotechnologies Department

Peoples' Friendship University of Russia

Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

²FGBU "The All-Russian center of quarantine of plants"

*Pogranichnaya str., 32, settlement of Bykovo, Ramensky district,
Moscow Region, Russia, 140150*

For the detection and identification of *Candidatus Phytoplasma vitis* Flavescence doree — the yellowing grape quarantine pest for the territory of Russia and *Candidatus Phytoplasma solani* Bois noir — pathogen of blackening crust grape was used one of the existing methods of diagnosis PCR in "real time" (RT-PCR). Matched to the fragment 16SrRNA gene species-specific primer systems were tested for false positive and false negative results for the detection of plant material in the above two phytoplasmas. According to the results of PCR in "real time", it was determined that the studied pairs of primers allow the identification of target species phytoplasmas. Cross-reactions with other species phytoplasmas were not detected. Primers pairs do not give false positive reactions with gram-positive bacteria and some types of bacterial microflora grapes. The primer pairs and probes FDrt and BNrt can be used to detect and identify phytoplasmas — pathogens FD and BN in the regulated articles, as well as monitoring. RT-PCR method is considered to be relatively simple to implement and does not require time-consuming for the detection results.

Key words: diagnostics, phytoplasma, plant quarantine, PCR.