

Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов

Д.Л. БЕЛКИН,
заместитель начальника Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»

Г.Н. БОНДАРЕНКО,
начальник Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»

А.Б. ЯРЕМКО,
младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР»

Д.А. УВАРОВА,
младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. В статье освещено использование метода секвенирования по Сенгеру для видовой идентификации карантинных и особо опасных вредных организмов при проведении фитосанитарных исследований. Изложены материалы по истории и современному принципу метода капиллярного электрофореза. Представлены результаты применения метода секвенирования в ФГБУ «ВНИИКР» в научно-исследовательских целях и лабораторной практике.

Ключевые слова. Секвенирование по Сенгеру, карантин растений, видовая идентификация, полимеразная цепная реакция, вредный организм.



Как известно, ДНК была открыта в 1869 г. швейцарским ученым И.Ф. Мишером, в 1936 г. отечественный ученый А.Н. Белозерский доказал, что нуклеиновая кислота присутствует и в растениях. В 1953 г. Д. Уотсоном, Ф. Криком и М. Уилкинсом определена ее структура (Pareek et al., 2011). Лишь в 1984 г. британский генетик А. Джеффрис обнаружил, что ДНК уникальна для каждого организма. В 1983 г. К. Мюллис предложил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в процессе которого удалось синтезировать множество копий определенного участка ДНК

Sequencing Method in Identification of Species of Quarantine Pests

D.L. BELKIN,
Deputy Head of the Testing and Laboratory Center of FGBU "VNI IKR"

G.N. BONDARENKO,
Head of the Testing and Laboratory Center of FGBU "VNI IKR"

A.B. IAREMKO,
Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU "VNI IKR"

D.A. UVAROVA,
Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU "VNI IKR"

Abstract. The article covers the use of Sanger sequencing method for identification of species of quarantine and extremely dangerous pests during phytosanitary researches. It contains materials on history and modern principle of capillary electrophoresis method. It also describes the results of application of the sequencing method in FGBU "VNI IKR" for research purposes and laboratory practice.

Keywords. Sanger sequencing, plant quarantine, species identification, polymerase chain reaction, pest.

It is known that DNA was discovered in 1869 by the Swiss scientist J.F. Miescher, and in 1936 the Russian scientist A.N. Belozersky proved that nucleic acid is also present in plants. In 1953, D. Watson, F. Crick and M. Wilkins defined its structure (Pareek et al., 2011). It was not until 1984 that British geneticist A. Jeffreys discovered that DNA was unique to each organism. In 1983, K. Mullis pro-

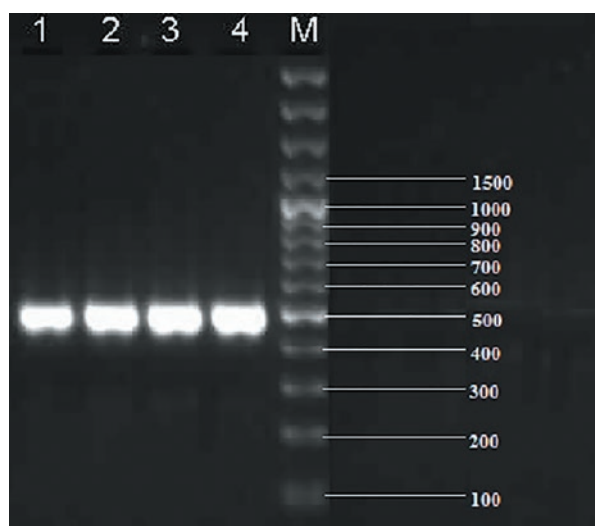


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР и размерность маркера молекулярного веса, п.н.

Fig. 1. Electrophoregram of PCR products and molecular weight marker dimension, bp

в искусственных условиях (Pettersson et al., 2009). Практическое применение метода ПЦР началось в медицине и ветеринарии. В фитосанитарии метод стал применяться позже.

История секвенирования берет начало с конца 60-х гг., когда Ф. Сенгером был разработан метод расшифровки нуклеотидных последовательностей. Первое прямое секвенирование ДНК было проведено в 1975 г., а в 1977 г. был разработан метод термినации цепи, который и по настоящее время является самым широко применяемым для определения последовательностей фрагментов ДНК (Чемерис и др., 1999). Данным способом был расшифрован весь геном человека, и именно автоматизированный метод Сенгера до сих пор является рутинным в повседневной лабораторной практике (Краснов и др., 2014).

В основе автоматического секвенирования лежит метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих азотистых оснований – дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP). Как и классический вариант метода Сенгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций (Seq-ПЦР) и разделение продуктов этих реакций с помощью капиллярного электрофореза на генетических анализаторах (AB-3500, «Applied Biosystems», США/Япония; Нанофор-05, ЗАО «Синтол», Россия).

Метод секвенирования, применяемый сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» при проведении исследований по идентификации карантинных объектов в продукции растительного происхождения, включает в себя 7 этапов:

1. Очистка продуктов ПЦР. Проводится с использованием коммерческого набора GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, США) по инструкции, предложенной производителем данного набора.

2. Измерение концентрации очищенных продуктов ПЦР. Измерение производится в трехкратной повторности на спектрофотометре NanoDrop 2000 с визуализацией данных в собственном

posed a polymerase chain reaction (PCR) method; with its help he was able to synthesize many copies of a particular DNA site under artificial conditions (Pettersson et al., 2009). Practical application of PCR has begun in medicine and veterinary medicine. In phytosanitary, the method was applied later.

The history of sequencing dates back to the late 1960s, when Sanger developed the method of decoding nucleotide sequences. The first direct sequencing of DNA was carried out in 1975, and in 1977 the method of chain termination was developed, which is still the most widely used to determine the sequence of DNA fragments (Chemeris et al., 1999). The entire human genome has been decoded in this way, and it is the automated Sanger method that is still routine in everyday laboratory practice (Krasnov et al., 2014).

Automatic sequencing is based on the method of enzymatic sequencing with the use of enduring nitrogen bases – dideoxynucleotides (ddATP, ddTTP, ddGTP or ddCTP). Like the classical variant of the Sanger method, automatic sequencing includes two stages: conducting terminating reactions (Seq-PCR) and separating the products of these reactions using capillary electrophoresis on genetic analyzers (AB-3500, Applied Biosystems, USA/Japan; Nanoфор-05, ZAO Sintol, Russia).

The method of sequencing applied by the staff of FGBU “VNIKR” when conducting research on the identification of quarantine objects in the products of plant origin, includes 7 stages:

1. Purification of PCR products. It is carried out with the use of commercial set GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, USA) according to the instructions offered by the manufacturer of this set.

2. Measurement of concentration of purified PCR products. The measurement is performed in triple repetition on the NanoDrop 2000 spectrophotometer with visualization of data in an in-house software (Thermo Fisher, USA), according to the instructions provided by the manufacturer of this device.

3. DNA dilution to working concentration. The working concentration of DNA depends on the size of the original amplification product, which is determined by the electrophoregram (Fig. 1).

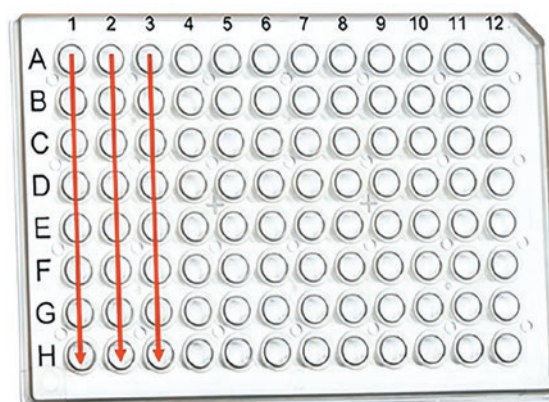


Рис. 2. Порядок внесения образцов в плашку для секвенирования

Fig. 2. Procedure of introduction of samples into the sequencing plate

программном обеспечении (Thermo Fisher, США), по инструкции, предложенной производителем данного прибора.

3. Разведение ДНК до рабочей концентрации. Рабочая концентрация ДНК зависит от размера исходного продукта амплификации, который определяется по электрофореграмме (рис. 1).

Если на электрофореграмме длина продукта составляет 500 п.н., то рабочая концентрация ДНК будет 5,0 нг/мкл, т.е. длина искомого продукта делится на 100.

Формула для расчета количества воды, необходимого для разведения концентрации ДНК:

$$y = \left(x : \left(\frac{c}{100} \right) - 1 \right) \cdot 4, \text{ где}$$

y – количество воды, необходимое для разведения (мкл);

x – концентрация ДНК, измеренная на NanoDrop (нг/мкл);

c – размер (длина) продукта, полученный на основании данных фореа (п.н.);

$$x : \left(\frac{c}{100} \right) - \text{число, соответствующее тому, во}$$

сколько раз необходимо развести образец ДНК;

1 – означает, что берем 1 мкл ДНК;

$$\left(x : \left(\frac{c}{100} \right) - 1 \right) - \text{микролитры воды;}$$

4 – увеличение концентрации ДНК.

Примечание: Если значение выражения

$x : \left(\frac{c}{100} \right) > 2$, требуется разведение концентрации.

Если $x : \left(\frac{c}{100} \right) < 2$, то разведение концентрации не требуется.

После расчета и внесения необходимого количества воды для каждого образца в пробирки добавляется по 4 мкл ДНК, а затем все смешивается и осаждается на центрифуге-вортекс Микроспин FV-2400 (Biosan, Латвия).

4. Терминирующая амплификация (Seq-ПЦР). Для проведения Seq-ПЦР используются праймеры с концентрацией 0,8 pm (пикомоль) и набор BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), реакционная смесь подготавливается по инструкции, предложенной производителем данного набора.

Процесс амплификации проходит по следующим параметрам:

Стадия 1. Температура +96 °C, 1 минута, 1 цикл;
 Стадия 2. Температура +96 °C, 10 секунд
 +50 °C, 5 секунд
 +60 °C, 4 минуты } 25 циклов
 Стадия 3. Температура +4 °C, 1 цикл.

5. Очистка образцов после Seq-ПЦР. Для очистки используется набор BigDye®XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher, США) согласно инструкции, предложенной производителем данного набора. После приготовления чистящего раствора и внесения в него образца используется перемешивание на термошейкере с охлаждением TS-100C (Biosan, Латвия) по следующей программе: 45 минут, 1400 об/мин, при температуре +4 °C. Это позволяет провести качественную очистку Seq-ампликонов от остаточных ddNTP.

6. Проведение капиллярного электрофореза. После очистки из пробирок отбирают по 25 мкл надосадочной жидкости и последовательно (рис. 2)

If the electrophoregram has a product length of 500 bp, the operating DNA concentration will be 5.0 ng/μl, i.e. the length of the required product is divided by 100 bp.

Formula to calculate the amount of water needed to dilute DNA concentration:

$$y = \left(x : \left(\frac{c}{100} \right) - 1 \right) \cdot 4, \text{ where}$$

y – amount of water required for dilution (μl);

x – DNA concentration measured on NanoDrop (ng/μl);

c – size (length) of the product based on the data of phoresis (bp);

$$x : \left(\frac{c}{100} \right) - \text{number corresponding to how many}$$

times the DNA sample should be diluted;

1 – means we take 1 μl of DNA;

$$\left(x : \left(\frac{c}{100} \right) - 1 \right) - \text{microlitres of water;}$$

4 – increase in DNA concentration.

Note: If the value of $x : \left(\frac{c}{100} \right) > 2$, it is required to

dilute the concentration. If $x : \left(\frac{c}{100} \right) < 2$, dilution is not required.

After calculating and applying the required amount of water for each sample, 4 μl DNA is added to the tubes, and then everything is mixed and precipitated in the Microspin FV-2400 vortex (Biosan, Latvia).

4. Terminating amplification (Seq-PCR). Seq-PCR uses 0.8 pm (picomol) primers and BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), the reaction mixture is prepared according to the manufacturer's instructions for this kit.

The amplification process follows the following parameters:

Stage 1. Temperature +96 °C, 1 minute, 1 cycle;
 Stage 2. Temperature +96 °C, 10 seconds
 +50 °C, 5 seconds
 +60 °C, 4 minutes } 25 cycles
 Stage 3. Temperature +4 °C, 1 cycle.

5. Purification of samples after Seq-PCR. The BigDye®XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher, USA) is used for cleaning according to the instructions provided by the manufacturer of this kit. After preparation of the purification solution, the sample is put into it and mixed on a TS-100C (Biosan, Latvia) thermoshaker according to the following program: 45 minutes, 1400 rpm, at +4 °C. It allows carrying out qualitative purification of Seq-amplicons from residual ddNTP.

6. Capillary electrophoresis. After purification, 25 μl of the supernatant is taken out of the tubes and sequentially (Fig. 2) transferred to a sequencing plate (Applied Biosystems, USA). If there are empty wells in one run when filling the plate (sequence of wells from 1A to 1H), they are filled with 25 μl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, USA). The plate is then covered with a rubber septum (Applied Biosystems, USA) (Fig. 3) and placed in a sequencing container (Fig. 4).

Then the genetic analyzer and the reading program are launched according to the length of the desired nucleotide sequence fragment.

переносят в плашку (планшет) для секвенирования (Applied Biosystems, США). Если при заполнении плашки остаются незаполненные лунки в одном ряде (последовательность лунок от 1А к 1Н), то в них вносят по 25 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, США). Далее плашку закрывают резиновой септой (Applied Biosystems, США) (рис. 3) и помещают в контейнер для секвенирования (рис. 4).

Далее запускают генетический анализатор и программу прочтения согласно длине искомого фрагмента нуклеотидной последовательности.

При проверке годности буферов и полимера в программу для секвенирования вносят названия образцов в той же последовательности, в какой они были внесены в плашку, и выбирают программы для каждого из образцов согласно таблице 1.

7. Биоинформационный анализ. Качество прочтения нуклеотидных последовательностей определяется в программе «Sequencing Analysis». Анализ, редактирование и выравнивание последовательностей проводятся в специализированной программе BioEdit, версия 7.2.5 (рис. 5).

Сравнение полученных результатов (последовательностей) секвенирования проводится с уже имеющимися в базе данных GenBank NCBI BLAST.

В 2018 г. специалистами ФГБУ «ВНИИКР» были подготовлены методические рекомендации по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов, в которых подробно описаны этапы подготовки проб, проведения Seq-ПЦР и капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе АВ-3500 (Бондаренко, Белкин, 2018).

С 2012 г., с внедрением в практику лабораторных исследований ФГБУ «ВНИИКР» метода секвенирования, ежегодно этим методом идентифицируются различные карантинные объекты в импортируемой и экспортируемой Российской Федерацией продукции растительного происхождения, а также в рамках научно-исследовательских работ.

В таблице 2 представлен список карантинных организмов с указанием генетических мишеней, с помощью которых возможна идентификация до вида с точностью до 100%. При внедрении метода секвенирования в фитосанитарную лабораторную практику для более чем 25 видов карантинных организмов применили расшифровку нуклеотидных последовательностей продуктов ДНК с целью подтверждения видовой принадлежности.

Согласно представленным данным, интерес к применению метода расшифровки нуклеотидных последовательностей с каждым годом возрастает. Например, за первый квартал 2019 г. специалистами ФГБУ «ВНИИКР» выполнено более 1500 анализов по прочтению фрагментов ДНК как в рамках научных изысканий, так и для подтверждения результатов лабораторных исследований.

Секвенирование применяется при разработке новых, оптимизации и усовершенствовании существующих методов диагностики вредных организмов, таких как фитоплазмы, бактерии, насекомые. Оригинальные данные, полученные при использовании секвенирования, зачастую становятся единственными генетическими маркерами для идентификации и подтверждения идентификации выявляемых карантинных вредных организмов.



Рис. 3. Закрывание плашки для секвенирования резиновой септой Fig. 3. Closing the sequencing plate with a rubber septum

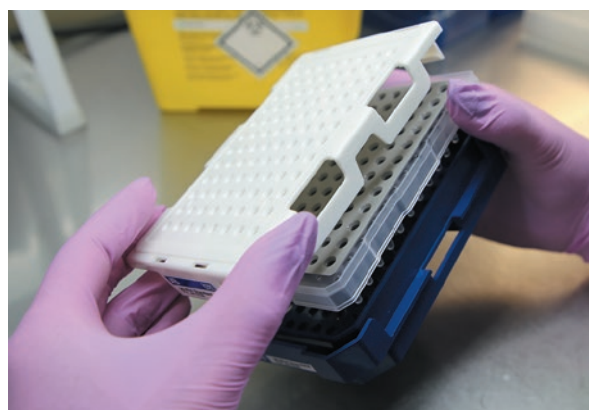


Рис. 4. Помещение плашки в контейнер для секвенирования Fig. 4. Putting a plate in a sequencing container

When checking the suitability of the buffers and polymer, the sequencing program includes the names of the samples in the same sequence as they were introduced into the plate and selects the programs for each of the samples according to Table 1.

7. Bioinformational analysis. The quality of reading nucleotide sequences is defined in the Sequencing Analysis program. Analysis, editing and alignment of the sequences are carried out in the specialized BioEdit program, version 7.2.5 (Fig. 5).

The obtained sequencing results (sequences) are compared with those already available in the GenBank NCBI BLAST database.

In 2018, specialists of FGBU “VNIKR” prepared methodological recommendations on sequencing for the diagnostics of quarantine objects and other organisms, which describe in detail the stages of sample preparation, Seq-PCR and capillary electrophoresis on the AB-3500 genetic analyzer (Bondarenko, Belkin, 2018).

Since 2012, with the introduction of the sequencing method into the practice of laboratory research by FGBU “VNIKR”, various quarantine objects in the products of plant origin imported and exported by the Russian Federation, as well as within the framework of research work, have been identified annually by this method.

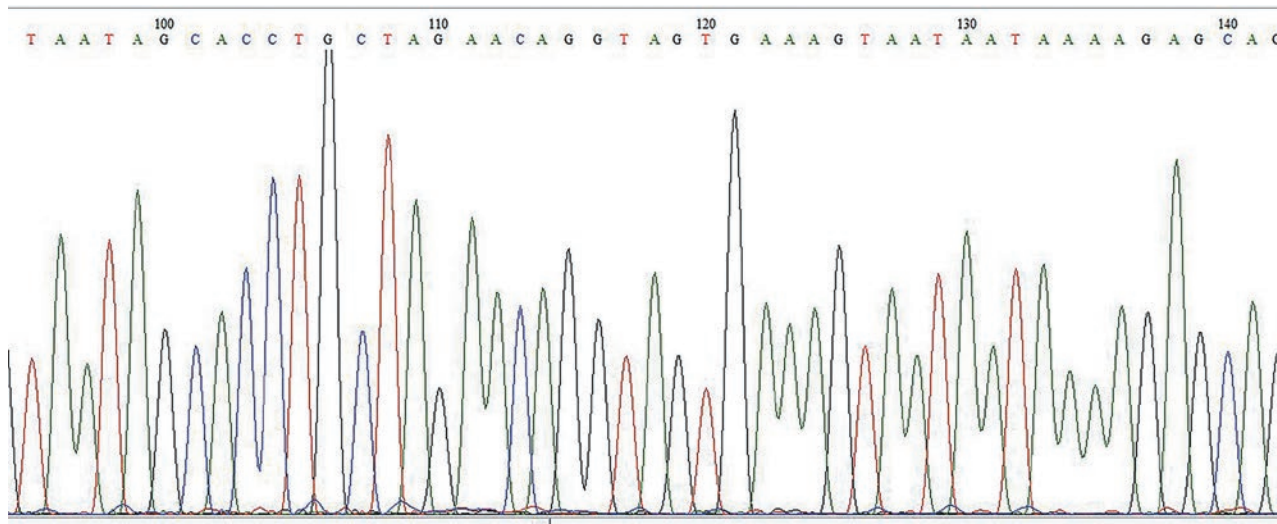


Рис. 5. Анализ нуклеотидных последовательностей в программе BioEdit 7.2.5

Fig. 5. Nucleotide sequence analysis in BioEdit 7.2.5

В настоящее время ФГБУ «ВНИИКР» активно использует метод секвенирования при проведении исследований продукции на наличие карантинных организмов. Метод в его современной интерпретации позволяет за один рабочий цикл (ран) в одном капилляре с точностью до 98% определить последовательность ДНК длиной до 1000 пар нуклеотидов (п.н.). Относительно невысокая его стоимость, точность, а также простота автоматизации делают этот метод все более широко используемым в лабораторной практике учреждений Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору.

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор) / Проблемы особо опасных инфекций, 2014. Vol. 2. С. 73-79.

Table 2 presents a list of quarantine organisms with genetic targets that can be used to identify to species with 100% accuracy. When introducing sequencing into the phytosanitary laboratory practice for more than 25 species of quarantine organisms, decoding of nucleotide sequences of DNA products was used to confirm their species.

According to the data presented, the interest in the application of the nucleotide sequence decoding method increases every year. For example, in the first quarter of 2019, specialists of FGBU “VNIKR” performed more than 1.500 analyses of DNA fragments as part of research and to confirm the results of laboratory tests.

Sequencing is used to develop new, optimized and improved methods of diagnostics of pests, such as phytoplasmas, bacteria and insects. Original sequencing data are often the only genetic markers for identifying and confirming the identification of detectable quarantine pests.

At present FGBU “VNIKR” actively uses the sequencing method to analyze product studies for the presence of quarantine organisms. The method in its modern interpretation allows for one working cycle (run) in one capillary with an accuracy of 98% to determine the sequence of DNA with length up to 1000 base pairs (bp). Its relatively low cost, accuracy, and ease of automation make this method more and more widely used in the laboratory practice of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance.

Таблица 1
Список программ для секвенирования

Название	Кол-во пар оснований	Приблизительное время окончания
Short_Read_Seq_Assay_POP7	100-300	30 минут
Rapid_Seq_Assay_POP7	300-500	40 минут
Fast_Seq_Assay_POP7	500-700	65 минут (1 час 05 мин)
Std_Seq_Assay_POP7	более 700	125 минут

Table 1
List of sequencing programs

Name	Number of base pairs	Estimated end time
Short_Read_Seq_Assay_POP7	100-300	30 minutes
Rapid_Seq_Assay_POP7	300-500	40 minutes
Fast_Seq_Assay_POP7	500-700	65 minutes (1 hour 05 min)
Std_Seq_Assay_POP7	over 700	125 minutes

REFERENCES

1. Krasnov IA.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. Modern DNA Sequencing Methods (Review) / Problems of Highly Dangerous Infections, 2014. Vol. 2. P. 73-79.

Таблица 2
Генетические мишени, применяемые в ФГБУ «ВНИИКР» для изучения и диагностики карантинных вредных организмов

№	Название карантинного организма	Участок генома
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Shaad et al.) – Бактериальная пятнистость тыквенных культур	16S, 23S гены
2	<i>Bactrocera dorsalis</i> Hend. – Восточная фруктовая муха	COI ген
3	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i> (Seemüller, Schneider) – Фитоплазма пролиферации яблони	16S-23S, tuf, map, secY гены
4	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i> (Seemüller, Schneider) – Фитоплазма истощения груши	16S-23S, tuf, map, secY гены
5	<i>Candidatus Phytoplasma vitis</i> – Фитоплазма золотистого пожелтения винограда	16S-23S, tuf, map, secY гены
6	<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) – Средиземноморская плодовая муха	COI ген
7	<i>Cercospora kikuchii</i> (T. Matsu & Tomoyasu) Gardn. – Пурпурный церкоспороз	TUB, ITS гены
8	<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds (= <i>C. xanthii</i> Halsted) – Антракноз земляники	Ef, TUB гены
9	<i>Drosophila suzukii</i> (Matsumura) – Азиатская ягодная дрозифила	COI ген
10	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al. – Бактериальный ожог плодовых культур	16S, WNTR гены
11	<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe – Соевая цистообразующая нематода	5.8S, 18S гены
12	<i>Ipomoea hederacea</i> (L.) Jacq. – Ипомея плющевидная	trnL, ndh, ndhC-trnV, MatK гены
13	<i>Liriomyza sativae</i> Blanchard – Овощной листовой минер	COI ген
14	<i>Lymantria dispar asiatica</i> Vnukovskij – Азиатский подвид непарного шелкопряда	COI ген
15	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew) – Многоядная муха-горбатка	COI ген
16	<i>Monilinia fructicola</i> (Winter) Honey – Бурая монилиозная гниль	ITS ген
17	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> (Smith) Mergaert et al. – Бактериальное увядание (вилт) кукурузы	16S ген
18	Peach latent mosaic viroid – Вироид латентной мозаики персика	фрагмент РНК (кДНК)
19	Plum pox potyvirus – Потивирус шарки (оспы) слив	фрагмент РНК (кДНК)
20	Potato spindle tuber viroid – Вироид веретеновидности клубней картофеля	фрагмент РНК (кДНК)
21	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comst. – Калифорнийская щитовка	COI ген
22	<i>Phytophthora fragariae</i> Hickman – Фитофторозная корневая гниль земляники и малины	Ypt1 ген
23	Raspberry ringspot nepovirus – Неповирус кольцевой пятнистости малины	фрагмент РНК (кДНК)
24	<i>Rathayibacter tritici</i> (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al. – Желтый слизистый бактериоз пшеницы	16S ген
25	<i>Tilletia indica</i> Mitra – Индийская (карнальская) головня пшеницы	Ef, TUB, ITS гены
26	Tobacco ringspot nepovirus – Неповирус кольцевой пятнистости табака	ген белка оболочки CP
27	Tomato ringspot nepovirus – Неповирус кольцевой пятнистости томата	фрагмент РНК (кДНК)
28	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al. – Бактериальное увядание винограда	16S ген

Table 2
Genetic targets used in FGBU “VNIKR” to study and diagnose quarantine pests

No.	Name of quarantine organism	Genome region
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Shaad et al.)	16S, 23S genes
2	<i>Bactrocera dorsalis</i> Hend.	COI gene
3	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma mali</i> (Seemüller, Schneider)	16S-23S, tuf, map, secY genes
4	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma pyri</i> (Seemüller, Schneider)	16S-23S, tuf, map, secY genes
5	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma vitis</i>	16S-23S, tuf, map, secY genes
6	<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann)	COI gene
7	<i>Cercospora kikuchii</i> (T. Matsu & Tomoyasu) Gardn.	TUB, ITS genes
8	<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds (= <i>C. xanthii</i> Halsted)	Ef, TUB genes
9	<i>Drosophila suzukii</i> (Matsumura)	COI gene
10	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.	16S, WNTR genes
11	<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe	5.8S, 18S genes
12	<i>Ipomoea hederacea</i> (L.) Jacq.	trnL, ndh, ndhC-trnV, MatK genes
13	<i>Liriomyza sativae</i> Blanchard	COI gene
14	<i>Lymantria dispar asiatica</i> Vnukovskij	COI gene
15	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)	COI gene
16	<i>Monilinia fructicola</i> (Winter) Honey	ITS gene
17	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> (Smith) Mergaert et al.	16S gene
18	Peach latent mosaic viroid	RNA fragment (cDNA)
19	Plum pox potyvirus	RNA fragment (cDNA)
20	Potato spindle tuber viroid	RNA fragment (cDNA)
21	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comst.	COI gene
22	<i>Phytophthora fragariae</i> Hickman	Ypt1 gene
23	Raspberry ringspot nepovirus	RNA fragment (cDNA)
24	<i>Rathayibacter tritici</i> (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al.	16S gene
25	<i>Tilletia indica</i> Mitra	Ef, TUB, ITS genes
26	Tobacco ringspot nepovirus	CP coat protein gene
27	Tomato ringspot nepovirus	RNA fragment (cDNA)
28	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al.	16S gene

2. Бондаренко Г.Н., Белкин Д.Л. Методические рекомендации по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов. М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2018. 34 с.

3. Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999. 428 с.

4. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing // J. Appl. Genetics, 2011. Vol. 52, № 4. P. 413-435.

5. Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. Generations of sequencing technologies // Genomics, 2009. Vol. 93, № 2. P. 105-111.

6. [Электронный ресурс]. Международная база генетических данных. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2. Bondarenko G.N., Belkin D.L. Methodological Recommendations on Sequencing in Diagnostics of Quarantine Objects and Other Organisms. M.: FGBU “VNIKR”, 2018. 34 p.

3. Chemeris A.V., Ahunov E.D., Vahitov V.A. DNA Sequencing. M.: Nauka, 1999. 428 p.

4. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing // J. Appl. Genetics, 2011. Vol. 52, № 4. P. 413-435.

5. Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. Generations of sequencing technologies // Genomics, 2009. Vol. 93, № 2. P. 105-111.

6. [Electronic resource]. International genetic database. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.