

Применение коммерческого набора «Сорб-ГМО-А» для выделения бактериальной ДНК возбудителя ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*) из растений

Л.А. КОНОНЕНКО,
к.б.н., старший агроном отдела карантина
растений ФГБУ «Белгородская МВЛ»

Т.А. РЫЖКОВА,
к.б.н., специалист отдела карантина растений
ФГБУ «Белгородская МВЛ»

Аннотация. В статье приводятся результаты испытания коммерческого набора «Сорб-ГМО-А» производства ЗАО «Синтол» для выделения бактериальной ДНК *Erwinia amylovora* из клеточной культуры возбудителя, гербарного материала, а также свежих и замороженных частей растений.

Ключевые слова. Коммерческий набор «Сорб-ГМО-А», реактивы для выделения ДНК, сорбент, карантинный организм, эффективность, *Erwinia amylovora*.

ВВЕДЕНИЕ

Белгородской области действует программа, согласно которой к 2026 году в регионе планируется производить 1 млн тонн плодовых и косточковых культур. Фермеры активно закладывают фруктовые сады. Самой популярной культурой является яблоня. Пока регион способен производить 30 тыс. тонн яблок в год, однако этот показатель можно увеличить в несколько раз. В ближайшие десять лет планируется организовать производство миллиона тонн яблок – фактически треть всего яблочного импорта.

В настоящее время производственные мощности отечественных питомников не позволяют в полной мере осуществлять данную программу, в связи с чем возникает необходимость в импорте посадочного материала (Каримова и др., 2018). При увеличении объемов импорта саженцев возрастает

Application of Commercial Sorb-GMO-A Kit for Isolation of Bacterial DNA of Fireblight (*Erwinia amylovora*) from Plants

L.A. KONONENKO,
PhD in Biology, Senior Agronomist of the Plant
Quarantine Department of FGBU Belgorod MVL

T.A. RYZHIKOVA,
PhD in Biology, Specialist of the Plant Quarantine
Department of FGBU Belgorod MVL

Abstract. The article presents the results of the test of the commercial set Sorb-GMO-A produced by ZAO Sintol for the isolation of bacterial DNA *Erwinia amylovora* from the cell culture of the pathogen, herbal material, as well as fresh and frozen parts of plants.

Keywords. Commercial set Sorb-GMO-A, reagents for DNA extraction, sorbent, quarantine organism, efficiency, *Erwinia amylovora*.

INTRODUCTION

In Belgorod region there is a program, according to which the region plans to produce 1 million tons of pomefruit and stone fruit crops by 2026. Farmers are actively laying down fruit orchards. The most popular crop is apple tree. So far, the region is able to produce 30 thousand tons of apples per year, but this figure can be increased several times. In the next ten years it is planned to organize the production of one million tons of apples which is in fact one third of all apple imports.

Currently, the production capacity of domestic nurseries does not allow for the full implementation of this program, and therefore there is a need

опасность завоза карантинных вредных организмов, в частности возбудителей вирусных и бактериальных заболеваний, из зараженных зон на территорию РФ.

Одним из опаснейших заболеваний является бактериальный ожог плодовых культур. Это некротическое заболевание, вызываемое бактерией *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Оно поражает более 180 видов древесных и кустарниковых растений из семейства Розоцветные. Наиболее восприимчивы к патогену груша, кизильник, боярышник, айва, яблоня, поражаются ирга, рябина и др. По степени вредоносности этот бактериоз не имеет равных среди известных болезней плодовых культур. При благоприятных для развития заболевания условиях может пройти всего несколько недель от заражения до полной гибели молодого дерева. Впервые бактериальный ожог был описан еще в 1780-х годах в Северной Америке, а на данный момент это заболевание зарегистрировано более чем в 40 странах, включая соседние с РФ Польшу, Украину и Литву. В 2007 году были зафиксированы вспышки бактериального ожога в яблоневых садах Республики Беларусь – в Мядельском и Узденском районах Минской области. В мире ежегодные убытки от этого заболевания составляют десятки миллионов долларов (Кудина и др., 2008).

Долгое время в Российской Федерации бактериальный ожог считался объектом внешнего карантина. В 2003 году он был зарегистрирован в Калининградской области (Александров, 2009). В последнее десятилетие заболевание выявляется в нескольких центральных и южных регионах европейской части РФ, ежегодно расширяя свой ареал (Харченко, 2009; Дренова и др., 2017). По сведениям Россельхознадзора, в настоящее время очаги обнаружены в Белгородской, Воронежской, Калининградской, Липецкой, Самарской, Саратовской, Тамбовской областях, в республиках Дагестан, Крым, Карачаево-Черкесия, в Краснодарском и Ставропольском краях. В Брянской, Волгоградской, Смоленской областях и Республике Кабардино-Балкария ранее выявленные очаги ликвидированы. По данным Территориального управления Россельхознадзора по Белгородской области, к 2018 году в Шебекинском и Прохоровском районах выявлены три очага бактериального ожога плодовых культур площадью 25,06 га.

На основании Федерального закона от 21.07.2014 г. № 206-ФЗ «О карантине растений» и приказа № 261 от 11.05.2018 г. Управления Россельхознадзора по Белгородской области, необходимо проводить контрольные карантинные фитосанитарные обследования и осуществлять мониторинг карантинного фитосанитарного состояния территории Белгородской области. Во избежание дальнейшего распространения бактериального ожога на территории области крайне важно применять методы быстрого выявления возбудителя из различных типов тканей и эффективные способы защиты растений.

В аккредитованных лабораториях Россельхознадзора допускается использование только валидированных тестов с использованием тест-систем как импортного, так и отечественного производства. В последние годы российские компании расширяют ассортимент тест-систем, которые после соответствующей апробации могут быть рекомендованы для применения в карантинных лабораториях.

to import planting material (Karimova et al., 2018). With increasing imports of seedlings, there is a growing risk of quarantine pests, particularly viral and bacterial pathogens, being imported from infected areas into Russia.

One of the most dangerous diseases is the fireblight. It is a necrotic disease caused by the bacteria *Erwinia amylovora* (Burrill) (Winslow et al.). It affects more than 180 species of trees and shrubs from the Rosaceae family. The most susceptible to the pathogen are pear, cotoneaster, hawthorn, quince, apple, iris, mountain ash, etc. In terms of harmfulness, this fireblight has no equal among known diseases of fruit crops. In case of favorable conditions for the development of the disease, it may take only a few weeks from infection to the complete death of a young tree. The fireblight was first described in the 1780s in North America, and at the moment this disease is registered in more than 40 countries, including neighboring Poland, Ukraine and Lithuania. In 2007, outbreaks of the fireblight were recorded in apple orchards of the Republic of Belarus in Myadelskiy and Uzdenskiy districts of Minsk region. Worldwide, annual losses from this disease amount to tens of millions of dollars (Kudina et al., 2008).

For a long time in the Russian Federation, the fireblight was considered an object of external quarantine. In 2003, it was recorded in the Kaliningrad region (Aleksandrov 2009). In the last decade, the disease has been detected in several central and southern regions of the European part of the Russian Federation, expanding its range annually (Kharchenko, 2009; Drenova et al., 2017). According to Rosselkhoz nadzor, foci are currently found in Belgorod, Voronezh, Kaliningrad, Lipetsk, Samara, Saratov, Tambov regions, the Republics of Dagestan, Crimea, Karachay-Cherkessia, Krasnodar and Stavropol krai. In the Bryansk, Volgograd and Smolensk regions and the Republic of Kabardino-Balkaria, previously identified foci have been eliminated. According to the Territorial Administration of Rosselkhoz nadzor for the Belgorod region, three fireblight outbreaks with an area of 25.06 hectares were identified in Shebekino and Prokhorovka districts by 2018.

Based on the Federal Law of 21.07.2014 No. 206-FZ “On Plant Quarantine” and Order No. 261 of 11.05.2018 of Rosselkhoz nadzor Administration for the Belgorod region, it is necessary to conduct control phytosanitary inspections and monitor the quarantine phytosanitary condition of the territory of Belgorod region. In order to avoid further spread of the fireblight on the territory of the region it is extremely important to apply methods of rapid identification of the pathogen from different types of tissues and effective methods of plant protection.

In accredited Rosselkhoz nadzor laboratories only validated tests using both imported and domestically produced test systems are allowed. In recent years, Russian companies have been expanding the range of test systems, which can be recommended for use in quarantine laboratories after appropriate approbation. In this regard, the task of our research was to test

В связи с этим в задачу наших исследований входило испытание коммерческого набора для выделения ДНК производства ЗАО «Синтол» «Сорб-ГМО-А», не использовавшегося ранее для ПЦР-диагностики карантинного возбудителя бактериального ожога плодовых культур *Erwinia amylovora*.

Выделение ДНК из образца является важным этапом молекулярно-генетического исследования. От качества его исполнения зависит успех всех последующих этапов диагностики патогена. В производственных лабораториях, при огромном потоке разнообразных растительных образцов, для ускорения проведения исследований желателен иметь один, но достаточно эффективный метод выделения ДНК. Неправильный выбор метода выделения или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК, непригодной для исследования, либо к потере ДНК. При этом необходимо, чтобы метод экстракции ДНК был достаточно простым, удобным, недорогим и воспроизводимым.

Общей проблемой при выделении ДНК из многих видов растительных образцов считается наличие вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы (Collins, Symons, 1992). Поэтому исследователи предпочитают использовать для изолирования ДНК молодые органы растений, а именно молодые листья, поскольку они содержат меньшие количества запасных веществ и вторичных метаболитов. Однако подобные образцы по ряду причин далеко не всегда доступны, и приходится модифицировать методы для получения удовлетворительных результатов из органов взрослых растений, гербарного материала и др. (Ribeiro, Lovato, 2007). В некоторых случаях возникает необходимость анализировать замороженный или дегидрированный (гербарный) растительный материал, имеющий преимущество перед замороженным, поскольку нет необходимости хранить образцы в морозильной камере. Такой материал может транспортироваться на далекие расстояния.

В настоящее время широкое распространение получили методы выделения ДНК и РНК, основанные на связывании нуклеиновых кислот с сорбирующими носителями (Звягин, Трошин, 2010; Башмаков и др., 2012; Рябушкина и др., 2012; Сыромиятников и др., 2016). Использование сорбентов на основе оксида кремния (силики) имеет ряд преимуществ. По данным авторов, их использование позволяет почти полностью устранить ингибиторы реакции ПЦР; ДНК в экстракте двухцепочечная, стабильная; используемые реактивы безопасны; возможна автоматизация процесса.

Существуют различные наборы на основе оксида кремния, одним из которых является набор для выделения ДНК «Сорб-ГМО-А», разработанный ЗАО «Синтол» (РФ). Преимуществом этого набора является возможность экстракции ДНК из навесок сухих, влажных и жидких образцов. В качестве лизирующего агента набор содержит гуанидин-хлорид, который обеспечивает максимальный выход ДНК из растительных компонентов, и оксид кремния в качестве сорбента. Отличительными особенностями набора «Сорб-ГМО-А» являются быстрота выделения ДНК (особенно это важно при поступлении большого количества образцов для исследования с целью выявления патогенных бактерий, вирусов и грибов в определенные сезонные

а commercial kit Sorb-GMO-A for DNA extraction produced by ZAO Sintol, which had not been previously used for PCR diagnosis of the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*.

DNA extraction from the sample is an important step in molecular genetic study. The quality of its execution determines the success of all subsequent stages of the pathogen diagnosis. In production laboratories, with a large flow of various plant samples, it is desirable to have one, but effective method of DNA extraction to accelerate the research. Incorrect extraction method or its implementation may result in either a contaminated DNA that is unsuitable for the study or a loss of DNA. It is important that the DNA extraction method is simple, convenient, inexpensive and reproducible.

A common problem in the extraction of DNA from many plant samples is the presence of secondary metabolites such as polysaccharides and polyphenols (Collins, Symons, 1992). Researchers therefore prefer to use young plant organs, namely young leaves, to isolate DNA, as they contain fewer spare substances and secondary metabolites. However, such samples are not always available for a number of reasons, and it is necessary to modify the methods to obtain satisfactory results from adult plant organs, herbal material, etc. (Ribeiro, Lovato, 2007). In some cases, there is a need to analyze frozen or dehydrated (herbal) plant material, which has an advantage over frozen one, as there is no need to store samples in the freezer. This material can be transported over long distances.

Currently, DNA and RNA extraction methods based on binding nucleic acids to sorbent carriers are widely used (Zviagin, Troshin, 2010; Bashmakov et al., 2012; Riabushkina et al., 2012; Syromiatnikov et al., 2016). The use of sorbents based on silicon oxide (silica) has a number of advantages. According to the authors, their use almost completely eliminates PCR inhibitors; DNA in the extract is two-chain, stable; used reagents are safe; automated process is possible.

There are various kits based on silicon oxide, one of which is the Sorb-GMO-A DNA extraction kit developed by ZAO Sintol (Russia). The advantage of this kit is the ability to extract DNA from dry, wet and liquid samples. As a lysing agent, the kit contains guanidine chloride, which provides maximum DNA yield from plant components, and silicon oxide as a sorbent. Distinctive features of the Sorb-GMO-A kit are the speed of DNA extraction (it is especially important when a large number of samples are received for research to identify pathogenic bacteria, viruses and fungi at certain seasonal intervals) and the absence of chloroform, which ensures safe work with the kit.

The kit was previously used by a number of researchers to optimize DNA extraction from plant baits in the diagnosis of phytophthora pathogens (Kopina, 2013; Golovin, Kopina, 2014). According to researchers, the use of the Sorb-GMO-A DNA extraction kit for the diagnosis of *Ph. fragariae* and *Phytoplasma* spp. made it possible to obtain total DNA of acceptable purity (the

промежутки) и отсутствие хлороформа, что делает работу с набором более безопасной.

Ранее набор использовался рядом исследователей для оптимизации выделения ДНК из растительных приманок при диагностике возбудителей фитотрофов (Копина, 2013; Головин, Копина, 2014). Согласно данным исследователей, использование набора для выделения ДНК «Сорб-ГМО-А» для диагностики *Ph. fragariae* и *Phytoplasma* spp. позволило получать тотальную ДНК приемлемой чистоты (соотношение 260/280 составляло 1,78; соотношение 260/230 составляло 1,86). Величина полученных значений показывает, что препарат ДНК не содержал большого количества примесей белка или иных компонентов, остающихся после процедуры выделения. Следовательно, использование набора для выделения ДНК «Сорб-ГМО-А» позволило получить тотальную ДНК необходимой чистоты. Поэтому при постановке ПЦР в реальном времени были получены положительные результаты (Головин, Копина, 2014). Полученная ДНК была пригодна для использования в полимеразной цепной реакции, секвенировании и других манипуляциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель исследования: оценка пригодности набора «Сорб ГМО-А» для выделения ДНК *Erwinia amylovora* из растительного материала.

Задачи исследования

1. Отбор частей зараженных растений с симптомами.
2. Приготовление из них свежих, замороженных и гербарных образцов для анализа.
3. Приготовление навесок каждого типа образцов.
4. Выделение чистой культуры возбудителя и приготовление серии разведений.
5. Анализ образцов с использованием тестируемого набора для выделения ДНК.

Растительный материал отбирали в июле 2018 года при фитосанитарных обследованиях в Прохоровском и Шебекинском районах Белгородской области на территории частных приусадебных участков. В качестве биологического материала использовали части взрослых растений груши. Каждый образец содержал пять экземпляров частей растения с симптомами заболевания (некротизированные листья и побеги, плоды темно-коричневого и черного цвета), отобранных с одного дерева. Всего было проанализировано 100 образцов. Для тестирования использовали следующие образцы: гербарный материал, растительная ткань из органов взрослых растений, замороженные ткани растений, чистая культура возбудителя бактериального ожога плодовых.

При подготовке образца для исследования отбирали пораженные участки с захватом здоровой ткани. Образцы измельчали и закладывали на хранение в морозильную камеру при температуре -20 °С. Для приготовления гербария листья, стебли, плоды перекладывали фильтровальной бумагой, помещали под пресс и высушивали при комнатной температуре.

Свежие растительные части использовали для экстракции бактерий и последующего культивирования на питательных средах. Экстракцию и изоляцию возбудителя бактериального ожога из растений с симптомами осуществляли по схеме,

ratio of 260/280 was 1.78; the ratio of 260/230 was 1.86). The obtained values show that the DNA preparation did not contain large amounts of protein or other components remaining after the extraction procedure. Subsequently, the use of the Sorb-GMO-A DNA extraction kit allowed to obtain total DNA of the required purity. Therefore, positive results were obtained during real time PCR (Golovin, Kopina, 2014). The resulting DNA was suitable for use in polymerase chain reaction, sequencing and other manipulations.

MATERIALS AND STUDY METHODS

Purpose of the study: evaluation of the suitability of the Sorb GMO-A kit for the extraction of *Erwinia amylovora* DNA from plant material.

Study objectives

1. Sampling of parts of infected plants with symptoms.
2. Preparation of fresh, frozen and herbal samples for analysis.
3. Preparation of each type of specimen.
4. Extraction of a pure culture of the pathogen and preparation of a series of dilutions.
5. Sample analysis using a tested kit for DNA extraction.

Plant material was sampled in July 2018 during phytosanitary surveys in Prokhorovka and Shebekino districts of the Belgorod region in private homestead lands. Parts of adult pear plants were used as biological material. Each sample contained five specimens of plant parts with symptoms of disease (necrotized leaves and shoots, dark brown and black fruits) taken from one tree. A total of 100 samples were analyzed. The following samples were used for testing: herbal material, plant tissue from adult plant organs, frozen plant tissues, pure culture of the fireblight pathogen.

During the preparation of the sample for the study, the affected areas with healthy tissue were sampled. The samples were crushed and stored in a freezer at -20 °C. Leaves, stems and fruits were transferred with filter paper for herbarium preparation, placed under a press and dried at room temperature.

Fresh plant parts were used for the extraction of bacteria and subsequent cultivation on nutrient media. Extraction and isolation of the fireblight pathogen from plants with symptoms was carried out according to the scheme presented in STO VNIKR 4.001-2010, using the semi-selective medium of King B.

Before DNA extraction, a sample of fresh plant parts was crushed. According to the manufacturer's instructions, fresh plant samples can be classified as wet samples. In this case, the weight of the sample is between 50 and 200 mg. In the course of the experiment the weighted amount of the sample was a 50 mg.

To optimize this method, frozen plant material was also used as samples (samples were taken in the Prokhorovka district). The weighted amount of the samples was 50 mg.

Real-time PCR was used to evaluate the efficacy of DNA extraction of the pathogen. A series of corresponding samples were prepared for this purpose.

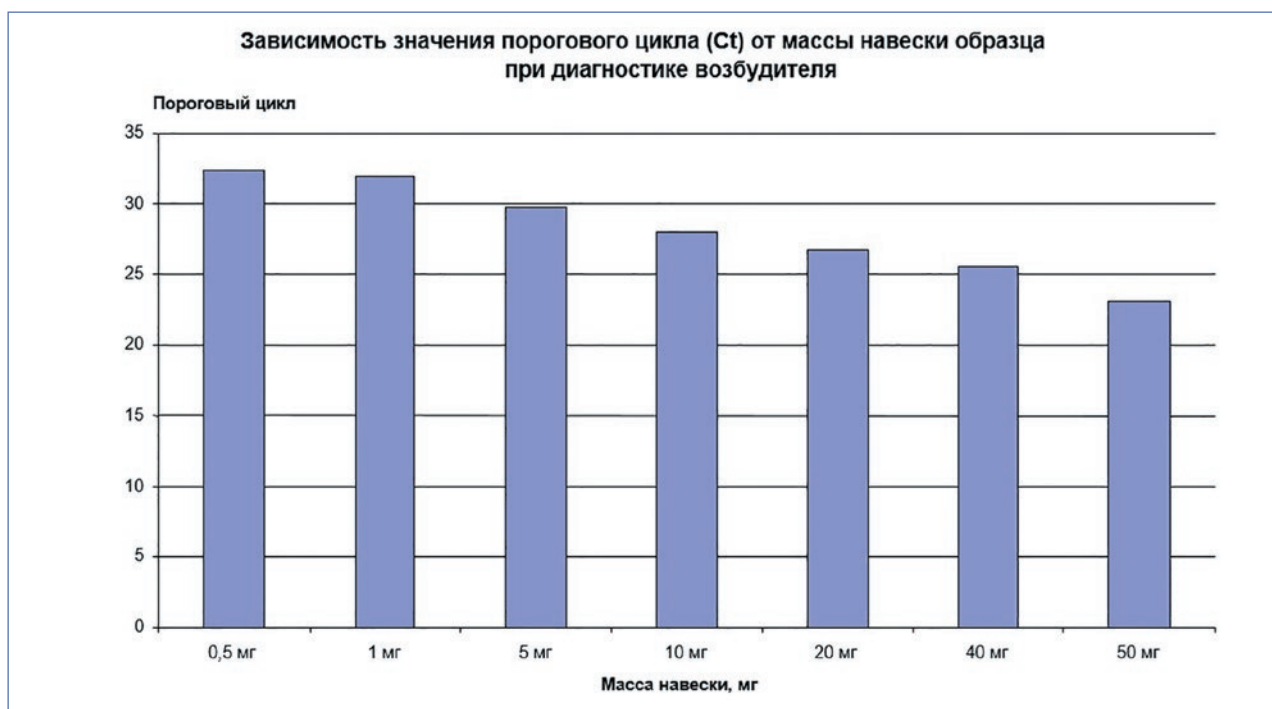


Рис. 1. Зависимость значения порогового цикла (Ct) от массы навески образца при диагностике возбудителя бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) методом ПЦР в реальном времени

Fig. 1. Dependence of the threshold cycle value (Ct) on the weighted amount of the sample suspension during the real-time PCR of the fireblight pathogen (*Erwinia amylovora*)

представленной в СТО ВНИИКР 4.001-2010, с использованием полуселективной среды Кинга Б.

Перед выделением ДНК образец свежих частей растений измельчали. Согласно инструкции производителя свежие растительные образцы можно отнести к категории «влажные образцы». В таком случае навеска составляет от 50 до 200 мг. В ходе эксперимента брали навеску в 50 мг.

Для оптимизации данного метода в качестве образцов использовали также замороженный растительный материал (образцы были отобраны на территории Прохоровского района). Навеска для образцов составляла 50 мг.

Чтобы оценить эффективность выделения ДНК патогена, использовали метод ПЦР в реальном времени. Для этого готовили серии соответствующих образцов.

Для получения серии разведений чистой культуры использовали суспензию патогена с концентрацией 10^8 КОЕ/мл.

Гербарный материал тщательно растирали в ступке до однородного состояния, готовили серию навесок и переносили в пробирки Эппендорфа. Рекомендуемая навеска по протоколу выделения составляет 50 мг сухого однородного образца. Готовили серию различных навесок из зараженного возбудителем гербарного материала (0,5 мг, 1 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 40 мг, 50 мг) для определения оптимальной навески, необходимой для выявления возбудителя бактериального ожога плодовых культур при постановке ПЦР в реальном времени.

Для исследований использовали набор «Сорб-ГМО-А», руководствуясь методикой, разработанной для выделения ДНК из растительных приманок при диагностике возбудителей фитофторозов (Копина, 2013; Головин, Копина, 2014).

Аmplification и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе CFX 96

To obtain a series of pure culture dilutions, a pathogen suspension with a concentration of 10^8 CFU/ml was used.

The herbal material was thoroughly grinded in a pounder to a homogeneous state, prepared a series of weighted samples and transferred them to Eppendorf tubes. The recommended weighted amount according to the extraction protocol is 50 mg of dry homogeneous sample. A series of different weighted amounts made of herbal material contaminated with the pathogen (0.5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 50 mg) was prepared to determine the optimal weighted amount needed to detect the fireblight pathogen when PCR was administered in real time.

The Sorb-GMO-A kit was used for studies based on the methodology developed for the isolation of DNA from plant baits in the diagnosis of phytophthora pathogens (Kopina, 2013; Golovin, Kopina, 2014).

Amplification and real-time detection were performed on the CFX 96 amplifier (Bio-Rad, USA). A set of Fitoskrin reagents (*Erwinia amylovora*-RV) manufactured by ZAO Sintol was used for real-time PCR.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA extracts from all types of samples using the Sorb-GMO-A kit were transparent and colorless, indicating a lack of significant amounts of secondary metabolites such as polysaccharides and polyphenols that give the extract a whitish shade and change the viscosity of the solution (Collins and Symons, 1992).

In order to evaluate the efficiency of DNA extraction of the pathogen from herbal material, a series of weighted amounts from 0.5 to 50 mg was analyzed.

Таблица 1
Значения порогового цикла для растительной ткани органов взрослых растений в начале фазы плодоношения

Тип образца	Пороговый цикл (Ct) по Fam <i>E. amylovora</i>	Пороговый цикл (Ct) по HEX ВПК
ПКО	28,77	32,71
ОКО	N/A	33,09
ОКО-В	N/A	33,56
11	25,96	33,49
12	22,00	33,30
13	28,36	33,37
14	16,63	33,46
15	29,50	33,41
16	23,19	33,45
17	35,07	33,17
18	27,07	33,15
19	34,88	32,75

(Bio-Rad, США). Для проведения ПЦР-РВ использовался набор серии реагентов «Фитоскрин» (*Erwinia amylovora*-РВ) производства ЗАО «Синтол».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракты ДНК, выделенной из всех типов образцов с помощью набора «Сорб-ГМО-А», были прозрачными и бесцветными, что указывает на отсутствие значимых количеств вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы, придающих экстракту белесый оттенок и изменяющих вязкость раствора (Collins, Symons, 1992).

Таблица 2
Значения порогового цикла (Ct) для замороженных образцов при диагностике *E. amylovora* методом ПЦР в реальном времени

Тип образца	Пороговый цикл (Ct) по Fam <i>E. amylovora</i>	Пороговый цикл (Ct) по HEX ВПК
ПКО	28,09	33,72
ОКО	N/A	33,93
ОКО-В	N/A	33,91
20	32,25	33,27
21	28,46	33,08
22	27,35	33,00
23	25,53	32,14
24	24,57	33,12
25	25,23	32,25
26	28,34	33,20
27	31,49	32,87
28	25,22	33,39
29	28,24	33,24

Table 1
Threshold cycle values for plant tissue of adult plant organs at the beginning of the fruiting phase

Sample type	Threshold cycle (Ct) according to Fam <i>E. amylovora</i>	Threshold cycle (Ct) according to HEX IPC
PCS	28,77	32.71
NCS	N/A	33.09
NCS-E	N/A	33.56
11	25.96	33.49
12	22.00	33.30
13	28.36	33.37
14	16.63	33.46
15	29.50	33.41
16	23.19	33.45
17	35.07	33.17
18	27.07	33.15
19	34.88	32.75

Figure 1 shows the data on the dependence of the threshold cycle (Ct) on the weighted amount mass of the sample during the real-time diagnosis of *Erwinia amylovora* by PCR.

Sorb-GMO-A DNA extraction kit is effective for DNA extraction from both a small amount of herbarized infected sample (0.5 mg) and acquisition of DNA of sufficiently high quality from a larger sample (at least 50 mg).

The next stage of our study was the analysis of fresh samples with typical symptoms of lesions (at the beginning of the fruiting phase) taken in

Table 2
Threshold cycle values (Ct) for frozen samples in real-time PCR of *E. amylovora*

Sample type	Threshold cycle (Ct) according to Fam <i>E. amylovora</i>	Threshold cycle (Ct) according to HEX IPC
PCS	28.09	33.72
NCS	N/A	33.93
NCS-E	N/A	33.91
20	32.25	33.27
21	28.46	33.08
22	27.35	33.00
23	25.53	32.14
24	24.57	33.12
25	25.23	32.25
26	28.34	33.20
27	31.49	32.87
28	25.22	33.39
29	28.24	33.24

Чтобы оценить эффективность выделения ДНК патогена из гербарного материала, анализировали серию навесок массой от 0,5 до 50 мг. На рисунке 1 представлены данные зависимости порогового цикла (Ct) от массы навески образца при диагностике *Erwinia amylovora* методом ПЦР в реальном времени.

Набор для выделения ДНК «Сорб-ГМО-А» эффективен для выделения ДНК как из небольшого количества гербаризованного зараженного образца (0,5 мг), так и получения ДНК достаточно высокого качества из образца большей массы (не менее 50 мг).

Следующим этапом наших исследований был анализ свежих образцов с типичными симптомами поражения (в начале фазы плодоношения), отобранных в Шебекинском районе Белгородской области. С использованием тестируемого набора удалось получить достоверные положительные результаты исследования всех образцов свежей естественно зараженной растительной ткани. Результаты диагностики *Erwinia amylovora* методом ПЦР в реальном времени представлены в таблице 1.

В наших исследованиях показана пригодность набора «Сорб-ГМО-А» для экстракции ДНК *E. amylovora* из замороженных образцов. Результаты представлены в таблице 2.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение возможности применения набора «Сорб-ГМО-А» для выделения ДНК из культуры клеток *E. amylovora*. Для этого готовили серию суспензий чистой культуры с различной степенью разведения.

На рисунке 2 представлена зависимость значения порогового цикла (Ct) от степени разведения культуры клеток патогена при диагностике *E. amylovora* методом ПЦР в реальном времени.

ВЫВОДЫ

В ходе исследований было показано, что выявление и последующая идентификация патогенного микроорганизма *Erwinia amylovora* в образцах плодовых культур возможна при сорбционном выделении ДНК на основе набора «Сорб-ГМО-А».

С помощью набора «Сорб-ГМО-А» возможно изолирование качественной ДНК из навесок свежего, замороженного и высушенного растительного материала с симптомами массой 0,5-50 мг и из широкого спектра разведений суспензии чистой культуры.

На наш взгляд, преимущество данного метода заключается в простоте, эффективности и стабильности выделения ДНК, а также возможности экстрагирования ДНК из разных типов (свежих, высушенных, замороженных) растительных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров И.Н. Бактериальный ожог плодовых культур в Российской Федерации. Историческая справка // Защита растений, 2009. № 12. С. 26-29.

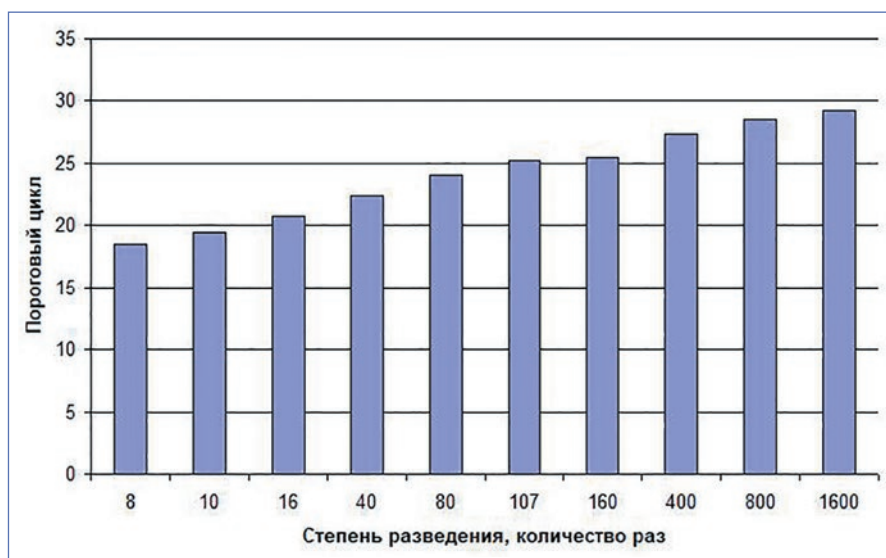


Рис. 2. Зависимость порогового цикла (Ct) от степени разведения культуры возбудителя бактериального ожога *E. amylovora*

Fig. 2. Dependence of the threshold cycle (Ct) on the degree of dilution of the fireblight pathogen culture of *E. amylovora*

Shebekino district of the Belgorod region. With the use of the test kit, we managed to obtain reliable positive results of the study of all samples of fresh naturally contaminated plant tissue. Results of diagnosis of *Erwinia amylovora* by real-time PCR are presented in Table 1.

Our study shows the suitability of the Sorb-GMO-A kit for the extraction of *E. amylovora* DNA from frozen samples. The results are presented in Table 2.

The next stage of our study was the assessment of the possibility of using the Sorb-GMO-A kit to extract DNA from *E. amylovora* cell culture. For this purpose, a series of pure crop suspensions with different degrees of dilution were prepared.

Figure 2 shows the dependence of the threshold cycle (Ct) value on the degree of pathogen culture dilution in the real-time PCR of *E. amylovora*.

CONCLUSIONS

During the study it was shown that the detection and subsequent identification of the pathogenic microorganism *Erwinia amylovora* in samples of fruit crops is possible in the sorbate extraction of DNA on the basis of Sorb-GMO-A kit.

Using Sorb-GMO-A, it is possible to extract quality DNA from fresh, frozen and dried plant material with symptoms of 0.5-50 mg and from a wide range of pure crop suspension dilutions.

In our opinion, the advantage of this method is the simplicity, efficiency and stability of DNA extraction, as well as the possibility of extraction of DNA from different types (fresh, dried, frozen) of plant samples.

REFERENCES

1. Aleksandrov I.N. Fireblight in the Russian Federation. Historical information // Plant Protection, 2009. No. 12. P. 26-29.

2. Башмаков В.Ю., Солодских С.А., Паневина А.В., Шматкова М.Л., Попов В.Н. Оптимизация изоляции ДНК из тканей печени крысы с использованием техники, основанной на сорбции нуклеиновых кислот // Сорбционные и хроматографические процессы, 2012. Т. 12. Вып. 5. С. 764-769.
3. Головин С.Е., Копина М.Б. Оптимизация выделения ДНК из биоприманок для диагностики методом ПЦР возбудителей фитофторозов малины и земляники в почве // Садоводство и виноградарство, 2014. № 2. С. 38-42.
4. Дренова Н.В., Ледяев А.М., Борисова И.П., Кольчихина М.С. Изучение эффективности препаратов Фитолавин, Фармайод, Стрекар против возбудителя бактериального ожога плодовых культур // Карантин растений. Наука и практика, 2017. № 4 (22). С. 41-51.
5. Звягин А.Н., Трошин Л.П. Выделение ДНК из листьев *Vitis vinifera* // Научный журнал КубГАУ, 2010. № 60 (06). С. 1-17.
6. Каримова Е.В., Приходько Ю.Н., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. Возбудитель пролиферации яблони *Candidatus phytoplasma mali* // Карантин растений. Наука и практика, 2018. № 3 (25). С. 4-8.
7. Копина М.Б. Фитофторозные корневые гнили малины и земляники, методы их диагностики. Автореферат ... канд. с.-х. наук. М., 2013, 23 с.
8. Кудина И.В., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н. Характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных на территории Беларуси // Труды БГУ, 2008. Том 3. Часть 1. С. 1-8.
9. Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учеб.-метод. пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. 142 с.
10. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика, 2012. № 2. С. 9-26.
11. Сыромятников М.Ю., Лопатин А.В., Кокина А.В., Сальников А.В., Попов В.Н. Сравнительная характеристика сорбционных способов выделения бактериальной и грибковой ДНК из пыльцы // Сорбционные и хроматографические процессы, 2016. Т. 16. № 2. С. 251-257.
12. СТО ВНИИКР 4.001-2010 «Бактериальный ожог плодовых культур *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Методы выявления и идентификации», п. Быково, Московская обл., 2010. 67 с.
13. Харченко А.А. Ожог плодовых в Воронежской области // Защита и карантин растений, 2009. № 5. С. 34-35.
14. Murray M.G., Thomson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res., 1980. Vol. 8. P. 4321-4325.
15. Collins G.G., Symons R.H. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by modified procedure // Plant Mol. Biol. Rep., 1992. № 10 (3). P. 233-235.
16. Ribeiro R.A., Lovato M.B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of genus *Dalbergia* // Genet. Mol. Res., 2007. Vol. 6. P. 173-187.
2. Bashmakov V.I., Solodskikh S.A., Panevina A.V., Shmatkova M.L., Popov V.N. Optimization of DNA isolation from rat liver tissue using a technique based on nucleic acid sorption // Sorption and Chromatographic Processes, 2012. Vol. 12. Issue 5. P. 764-769.
3. Golovon S.E., Kopina M.B. Optimization of DNA extraction from bio-baits for PCR diagnosis of raspberry and strawberry pathogens in soil // Gardening and Viticulture, 2014. No. 2. P. 38-42.
4. Drenova H.B., Lediaev A.M., Borisova I.P., Kolychikhina M.S. Efficacy study of Fitolavin, Farmayod, Strekar against the fireblight pathogen // Plant Health. Research and Practice, 2017. No. 4 (22). P. 41-51.
5. Zviagin A.N., Troshin L.P. DNA extraction from leaves of *Vitis vinifera* // Scientific magazine of the Kuban State Agrarian University, 2010. No. 60 (06). P. 1-17.
6. Karimova E.V., Prikhodko I.N., Shneider I.A., Smirnova I.P. Pathogen of apple proliferation *Candidatus phytoplasma mali* // Plant Health. Research and Practice, 2018. No. 3 (25). P. 4-8.
7. Kopina M.B. Phytophthora root rot of raspberries and strawberries, their diagnosis methods. Thesis abstract... PhD in Agriculture. M., 2013, 23 p.
8. Kudina I.V., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N. Characteristics of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*, extracted in the territory of Belarus // Papers of BSU, 2008. Vol. 3. Part 1. P. 1-8.
9. Kutlunina N.A., Ermoshin A.A. Molecular genetic methods in plant research: a study guide. Yekaterinburg: Publishing house of the Ural Federal University, 2017. 142 p.
10. Riabushkina N.A., Omashева M.E., Galiakparov N.N. Specifics of DNA extraction from plant objects // Biotechnology. Theory and Practice, 2012. No. 2. P. 9-26.
11. Syromiatnikov M.I., Lopatin A.V., Kokina A.V., Salnikov A.V., Popov V.N. Comparative characterization of sorption methods of bacterial and fungal DNA extraction from pollen // Sorption and Chromatographic processes, 2016. Vol. 16. No. 2. P. 251-257.
12. SТО VNIИKR 4.001-2010 "Fireblight *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. DETECTION AND IDENTIFICATION METHODS", P. BYKOVО, MOSCOW REGION, 2010. 67 P.
13. Kharchenko A.A. Fireblight in the Voronezh region // Plant Protection and Quarantine, 2009. No 5. P. 34-35.
14. Murray M.G., Thomson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res., 1980. Vol. 8. P. 4321-4325.
15. Collins G.G., Symons R.H. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by modified procedure // Plant Mol. Biol. Rep., 1992. № 10 (3). P. 233-235.
16. Ribeiro R.A., Lovato M.B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of genus *Dalbergia* // Genet. Mol. Res., 2007. Vol. 6. P. 173-187.