

Разработка методов диагностики вириода латентной мозаики персика (PLMVd)

Ю.Н. ПРИХОДЬКО¹, Т.С. ЖИВАЕВА²,
Е.Н. ЛОЗОВАЯ³, Ю.А. ШНЕЙДЕР⁴, Е.В. КАРИМОВА⁵
ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия

¹ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

² e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

³ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Вириод латентной мозаики персика (PLMVd) является карантинным вредным организмом, включенным в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза в список карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории Евразийского экономического союза.

Вириод латентной мозаики персика поражает косточковые плодовые культуры, вызывая значительные потери урожая. Методы выявления и идентификации этого патогена в Российской Федерации были разработаны сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» в 2015–2018 гг.

В статье приводятся результаты испытаний и валидации нескольких пар видоспецифичных праймеров, используемых в мировой практике для диагностики PLMVd методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также результаты экспериментов с праймерами, разработанными авторами.

Ключевые слова. Peach latent mosaic viroid, ПЦР, обратная транскрипция, специфичность, чувствительность, воспроизводимость.

ВВЕДЕНИЕ

Вириод латентной мозаики персика (Peach latent mosaic viroid, PLMVd) является типовым представителем рода *Pelamoviroid* семейства *Avsunviroidae*. Этот патоген отсутствует на территориях стран, входящих в состав ЕАЭС (Россия, Кыргызстан, Казахстан, Армения, Беларусь).

PLMVd представляет собой бескапсидную кольцевую одноцепочечную РНК, локализованную в клетках инфицированных растений, которая не выявляется даже при использовании электронного микроскопа. Из-за отсутствия белковой оболочки

Development of diagnostic methods of Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd)

YU.N. PRIKHODKO¹, T.S. ZHIVAEVA²,
E.N. LOZOVAYA³, YU.A. SHNEYDER⁴, E.V. KARIMOVA⁵
FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center”
(FGBU “VNIKCR”), Bykovo, Ramenskoye,
Moscow Oblast, Russia

¹ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

² e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

³ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru

ABSTRACT

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) is a quarantine pest included in the Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union, the list of quarantine pests absent in the Eurasian Economic Union.

PLMVd affects stone fruit crops, causing significant yield losses. Methods for the detection and identification of this pathogen in the Russian Federation were developed by the specialists of FGBU “VNIKCR” in 2015–2018.

The article presents the results of testing and validation of several pairs of species-specific primers used in world practice for the diagnosis of PLMVd by the polymerase chain reaction (PCR) method, as well as the results of experiments with primers developed by the authors.

Key words. Peach latent mosaic viroid, PCR, reverse transcription, specificity, sensitivity, reproducibility.

INTRODUCTION

Peach latent mosaic viroid, PLMVd, is a typical representative of the genus *Pelamoviroid* of the family *Avsunviroidae*. This pathogen is absent in the territories of the EAEU countries (Russia, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Armenia, Belarus).

PLMVd is a capsid circular single-stranded RNA localized in the cells of infected plants, which is not detected even when using an electron microscope.

применение серологических методов диагностики для выявления вириода латентной мозаики персика невозможно.

Для определения PLMVd используют биотесты на растениях-индикаторах и молекулярные методы диагностики.

Впервые метод ПЦР для выявления PLMVd был апробирован в США с использованием праймеров PLMVd-c/PLMVd-h (Shamloul et al., 1995). В дальнейшем другими авторами были разработаны праймеры для использования в различных модификациях метода ПЦР. Тем не менее международно признанный диагностический протокол выявления и идентификации PLMVd по-прежнему отсутствует. В Российской Федерации до исследований специалистов ФГБУ «ВНИИКР» диагностика PLMVd методом ПЦР не была апробирована.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились со следующими изолятами вириода латентной мозаики персика: PLMVd PC-1134 (DSMZ, Германия), PLMVd-IVIA (IVIA, Испания), Magn-1, Pyt-1, Pyt-2 и Pyt-3 (ФГБУ «ВНИИКР», Россия). Изоляты PLMVd – Magn-1, Pyt-1, Pyt-2 и Pyt-3 – были выявлены и идентифицированы специалистами научного подразделения ФГБУ «ВНИИКР» в плодах персика импортного происхождения. Зараженный материал хранился при температуре –80 °С.

Оценку специфичности испытуемых праймеров проводили с референтными изолятами нецелевых вириодов из коллекции DSMZ: вириода рубцеватости плодов яблони (ASSVd PC-1136), вириода пузырчатого рака коры груши (PBCVd PC-1135), вириода веретеновидности клубней картофеля (PSTVd PV-0860) и вириода карликовости хризантемы (CSVd PV-0735).

Выделение РНК изучаемых изолятов вириода выполняли со следующими комплектами реагентов для выделения нуклеиновых кислот, изготовленными отечественными производителями: «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия) «НК-М-Сорб» и «ФитоСорб» (оба – ООО «Синтол», Россия).

Для реакции обратной транскрипции использовали следующие наборы и реагенты:

- 1) «Комплект реагентов для обратной транскрипции» (ООО «АгроДиагностика», Россия), в состав которого входит праймер OT-Random;
- 2) «MMLV RT Kit» (ЗАО «Евроген», Россия);
- 3) «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific, США);
- 4) «Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit RT-qPCR» (Thermo Scientific, США).

При постановке реакции обратной транскрипции испытывали следующие праймеры: Oligo dT₁₈, Oligo dT₁₇, Random dN₆ и Random dN₁₀.

Наборы использовали согласно инструкциям фирм-производителей.

Для отработки диагностики PLMVd методом классической ПЦР были испытаны праймеры cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999), RF-44 F/RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R, PLMVd-P3F/PLMVd-P4R, PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (RMDVB FGBU «ВНИИКР»^{*}).

^{*} НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» – научно-методический отдел вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР».

Due to the lack of a protein coat, the use of serological diagnostic methods for detecting the PLMVd is impossible.

To identify PLMVd, bioassays on indicator plants and molecular diagnostic methods are used.

The PCR method for detecting PLMVd was first tested in the USA using the PLMVd-c/PLMVd-h primers (Shamloul et al., 1995). Later, other authors developed primers for use in various modifications of the PCR method. However, an internationally recognized diagnostic protocol for the detection and identification of PLMVd is still lacking. In the Russian Federation, before the research of specialists of the FGBU «VNIICR», the diagnosis of PLMVd by PCR was not tested.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out with the following PLMVd isolates: PLMVd PC-1134 (DSMZ, Germany), PLMVd-IVIA (IVIA, Spain), Magn-1, Pyt-1, Pyt-2, and Pyt-3 (VNIICR, Russia). PLMVd isolates – Magn-1, Pyt-1, Pyt-2 and Pyt-3 – were detected and identified by specialists of the scientific department of the FGBU «VNIICR» in peach fruits of imported origin. The infected material was stored at –80 °C.

Evaluation of the specificity of the tested primers was carried out with reference isolates of non-target viroids from the DSMZ collection: apple scar skin viroid (ASSVd PC-1136), pear blister canker viroid (PBCVd PC-1135), potato spindle tuber viroid (PSTVd PV-0860) and chrysanthemum stunt viroid (PV-0735).

Isolation of RNA of the studied viroid isolates was performed with the following sets of reagents for the isolation of nucleic acids manufactured by domestic manufacturers: PREP-NA (AgroDiagnostica, Russia) NK-M-Sorb and FitoSorb (both – Syntol, Russia).

The following kits and reagents were used for the reverse transcription reaction:

- 1) «Reagent kit for reverse transcription» (AgroDiagnostica, Russia), which includes the primer OT-Random;
- 2) «MMLV RT Kit» (Evrogen, Russia);
- 3) «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific, USA);
- 4) «Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit RT-qPCR» (Thermo Scientific, USA).

When staging the reverse transcription reaction, the following primers were tested: Oligo dT₁₈, Oligo dT₁₇, Random dN₆ and Random dN₁₀.

The kits were used according to the manufacturer's instructions.

For testing PLMVd diagnostics by the method of classical PCR, primers were tested cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999), RF-44 F/RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R, PLMVd-P3F/PLMVd-P4R, PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (RMDVB FGBU «VNIICR»^{*}).

The primers IB-Fw/IB-Rev (Boubourakas et al., 2011) and PLMVd-P1F/PLMVd-P1R (RMDVB FGBU «VNIICR») tested by real-time PCR (RT-PCR) with the addition of SYBR Green dye.

^{*} Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU «VNIICR».

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных в экспериментах для отработки диагностики PLMVd методом ПЦР

Table 1

Characteristics of primers used in experiments for testing PLMVd diagnostics by PCR

Название праймера Primer name	Последовательность 5'→3' Sequence 5'→3'	Длина продукта (п. о.) Product length (bp)	Автор Author
PLMVd RF-43 R	CTGGATCACACCCCTCGGAACCAACCGCT	340	Ambrós et al., 1998
PLMVd RF-44 F	TGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACT		
cPLMVd	AAGTGCAGTGTCTCCGAATAGGGCAC	337	Loreti et al., 1999
hPLMVd	CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG		
PLMVd-H	CTCGCAATGAGGTAAGGTG	100	Luigi, Faggioli, 2011
PLMVd-C	ACGTCGTAATCCAGTTTCTAC		
PLMVd-P	CTTCTGGAACCAAGCGG		
PLMVd-P1F	AAGGCTAAGCACCTCGCAAT	98	НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» RMDVB FGBU “VNIKR”
PLMVd-P1R	TTTCTACGGCGGTACCTGGA		
PLMVd-P3F	GCCGTATCTCAACGGCTCAT	252	НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» RMDVB FGBU “VNIKR”
PLMVd-P4R	GAGGGGACCGGGTTTGAATC		
PLMVd-P9F	GCATCCCAGCGACTCATCA	248	НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» RMDVB FGBU “VNIKR”
PLMVd-P2R	GAGGGGACCGGGTTTGAATC		
IB-Fw	ACC TCG CAA TGA GGT AAG	118–120	Boubourakas et. al., 2011
IB-Rev	GGT TTG AAT CCC GGG TAG A		

Праймеры IB-Fw/IB-Rev (Boubourakas et. al., 2011) и PLMVd-P1F/PLMVd-P1R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») испытывали методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с добавлением красителя SYBR Green.

«Комплект реагентов для ПЦР-амплификации к-ДНК Peach latent mosaic viroid» (ООО «АгроДиагностика», Россия) и праймеры PLMVd-H/PLMVd-C с зондом PLMVd-P (Luigi, Faggioli, 2011) испытывали методом ПЦР-РВ.

Характеристика испытываемых праймеров приведена в таблице 1.

Для постановки ПЦР в экспериментах с PLMVd были испытаны следующие коммерческие наборы реагентов:

1. «Screen Mix-HS» (ЗАО «Евроген», Россия);
2. «5x Mas^{DD} TaqMIX-2025» с красным красителем (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия);
3. «Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific, США);
4. «5x Mag^{DD} TaqMIX-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия);
5. «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific, США);
6. «One-step RT-PCR kit» (Qiagen, Нидерланды);
7. «SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qPCR kit with ROX» (Invitrogen, США);
8. «qPCRmix-HS SYBR» (ЗАО «Евроген», Россия);
9. «qPCRmix-HS SYBR + High ROX» (ЗАО «Евроген», Россия);
10. «2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии ROX» (ООО «Синтол», Россия).

Детекцию результатов ПЦР в формате «Форез» осуществляли с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле. Величину продуктов амплификации измеряли, используя маркер молекулярного

«Set of reagents for PCR amplification of c-DNA Peach latent mosaic viroid» (AgroDiagnostica, Russia) and PLMVd-H/PLMVd-C primers with a PLMVd-P probe (Luigi, Faggioli, 2011) were tested by RT-PCR.

The characteristics of the tested primers are shown in Table 1.

For PCR in experiments with PLMVd, the following commercial reagent kits were tested:

1. “Screen Mix-HS” (Evrogen, Russia);
2. “5x Mas^{DD} TaqMIX-2025” with red dye (Dialat Ltd., Russia);
3. “Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific, USA);
4. “5x Mag^{DD} TaqMIX-2025” (Dialat Ltd., Russia);
5. “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific, USA);
6. “One-step RT-PCR kit” (Qiagen, Netherlands);
7. “SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qPCR kit with ROX” (Invitrogen, USA);
8. “qPCRmix-HS SYBR” (Evrogen, Russia);
9. “qPCRmix-HS SYBR + High ROX” (Evrogen, Russia);
10. “2.5x Reaction mixture for RT-PCR in the presence of ROX” (Syntol, Russia).

Detection of PCR results was carried out using electrophoresis in 1.5% agarose gel. Amplification products were measured using a GeneRuler 100 bp Plus DNA molecular weight marker from Thermo Scientific, USA.

The validity of the amplification products was determined by their sequencing.

веса ДНК GeneRuler 100 bp Plus фирмы Thermo Scientific, США.

Валидность продуктов амплификации определяли путем их секвенирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам исследования установлено, что испытуемые праймеры характеризуются высокой специфичностью к PLMVd, не реагировали с изолятами нецелевых виридов ASSVd, PBCVd, PSTVd и CSVd. Эффективность в выявлении изолятов целевого объекта существенно различалась. Так, праймеры PLMVd RF-44 F/PLMVd RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R и PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») позволяли диагностировать лишь от двух до четырех изолятов PLMVd из шести испытуемых, в связи с чем их дальнейшее испытание было признано нецелесообразным.

Для диагностики PLMVd с праймерами cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) и PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») были испытаны 1-этапный и 2-этапный форматы ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и 4 набора реагентов для ПЦР: «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen), «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific), «Screen Mix-HS» («Евроген»), «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат»). Для оценки воспроизводимости результатов эксперимента с каждым набором реагентов было проведено исследование в 3-кратной повторности.

При использовании праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) при проведении в 1-этапном формате ОТ-ПЦР с набором реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen) специфические продукты планируемой величины были получены для пяти изолятов PLMVd из шести испытуемых. При этом для трех изолятов наблюдалась низкая воспроизводимость результатов выявления. Попытка оптимизировать этот тест путем изменения температуры отжига праймеров не привела к желаемым результатам. Сделан вывод о низкой пригодности данного формата 1-этапной ОТ-ПЦР для выявления PLMVd с использованием праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) (табл. 2).

При испытании праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) методом 2-этапной ОТ-ПЦР на результаты тестов заметное влияние оказывал способ проведения обратной транскрипции. Так, ПЦР с набором реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и с кДНК, синтезированной набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) и универсальными праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈, позволяла диагностировать 5 изолятов PLMVd из шести испытуемых. Положительная реакция не была получена лишь с изолятом PLMVd-IVIA, который представляет собой сок инфицированного растения персика, нанесенный на мембрану для хранения нуклеиновых кислот; этот изолят характеризуется очень низкой концентрацией. В то же время 2-этапная ОТ-ПЦР с набором реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и с кДНК, синтезированной с набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и обратным специфическим праймером cPLMVd, позволила диагностировать все 6 испытуемых изолятов PLMVd.

RESULTS OF STUDIES

According to the results of the study, it was found that the tested primers are characterized by high specificity for PLMVd, did not react with the isolates of the non-target viroids ASSVd, PBCVd, PSTVd, and CSVd. Efficiency in identifying target isolates varied significantly. Thus, the primers PLMVd RF-44 F/PLMVd RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R, and PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (RMDVB FGBU “VNIIKR”) made it possible to diagnose only two up to four PLMVd isolates out of six subjects, in connection with which further testing was considered inappropriate.

For the diagnosis of PLMVd with primers cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) and PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology of (RMDVB) FGBU “VNIIKR”), 1-step and 2-step PCR formats with reverse transcription (RT-PCR) were tested and 4 PCR reagent kits: OneStep RT-PCR Kit (Qiagen), Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), Screen Mix-HS (Evrogen), 5x Mas^{DD} TaqMix-2025 (Dialat). To assess the reproducibility of the results of the experiment with each set of reagents, a study was carried out in 3 replicates.

When using the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) in 1-step RT-PCR format with the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen), specific target-size products were obtained for five PLMVd isolates out of six tested ones. At the same time, low reproducibility of detection results was observed for three isolates. An attempt

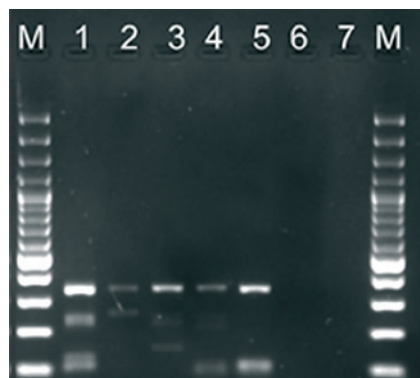


Рис. 1. Результаты экспериментов с праймерами cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999).

2-этапная ОТ-ПЦР; ОТ – набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) и праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈; ПЦР – набором «5x Mas^{DD} Mix-2025» («Диалат»).

Образцы: 1 – PLMVd PC-1134; 2 – Magn-1; 3 – Pyt-1; 4 – Pyt-2; 5 – Pyt-3; 6 – PLMVd-IVIA; 7 – отрицательный контроль (вода).

Fig. 1. Results of experiments with primers cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999).

2-step RT-PCR; OT – with First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers; PCR – with the kit “5x Mas^{DD} Mix-2025” (Dialat).

Samples: 1 – PLMVd PC-1134; 2 – Magn-1; 3 – Pyt-1; 4 – Pyt-2; 5 – Pyt-3; 6 – PLMVd-IVIA; 7 – negative control (water).

Таблица 2
Итоговая таблица ОТ-ПЦР для праймеров cPLMVd/hPLMVd

Table 2
Summary table of RT-PCR for primers cPLMVd/hPLMVd

Изоляты Isolates	1-этапная ОТ-ПЦР 1-step RT-PCR	2-этапная ОТ-ПЦР 2-step RT-PCR											
		«Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific)			«Mas ^{DD} Mix-2025» («Диалат») (Dialat)			«Screen Mix-HS» («Евроген») (Evrogen)					
		Обратная транскрипция Reverse transcription											
		«First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific)			«MMLV RT Kit» («Евроген») (Evrogen)			«First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific)			«MMLV RT Kit» («Евроген») (Evrogen)		
		«One step RT PCR» (Qiagen)			Праймеры для ОТ RT primers			Праймеры для ОТ RT primers			Праймеры для ОТ RT primers		
	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd	
PLMVd PC-1134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Magn-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Pyt-1	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Pyt-2	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	
Pyt-3	±	+	±	+	+	±	+	±	+	±	+	+	
PLMVd-IVIA	-	-	±	+	-	±	+	-	±	-	±	+	
ASSVd PC-1136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PBCVd PC-1135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PSTVd PV-0860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSVd PV-0735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Аналогичные результаты были получены для праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) при постановке реакции с набором для обратной транскрипции «MMLV RT Kit» («Евроген») совместно с реакционной смесью для ПЦР «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат»).

В экспериментах с праймерами cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) и набором реагентов «Screen Mix-HS» («Евроген») стабильная амплификация специфических продуктов наблюдалась для пяти изолятов PLMVd из шести испытуемых. В опыте с кДНК, синтезированной набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и обратным праймером cPLMVd, наблюдались также и следы специфического продукта для шестого испытуемого изолята PLMVd – IVIA (табл. 2).

В экспериментах с наборами реагентов для амплификации «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат») и набором для обратной транскрипции «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific), наряду со специфическими, наблюдалось также образование и неспецифических продуктов амплификации (рис. 1).

Таким образом, проведенные исследования показали возможность диагностики PLMVd с использованием праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999).

to optimize this test by changing the primer annealing temperature did not lead to the desired results. It was concluded that this format is not suitable for 1-step RT-PCR for detecting PLMVd using primers cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) (Table 2).

When testing the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) by 2-step RT-PCR, the test results were significantly influenced by the method of reverse transcription. Thus, PCR with a set of reagents “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific) and with cDNA synthesized by the “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific) and universal primers Random dN₆ + Oligo dT₁₈, allowed diagnosing 5 PLMVd isolates out of six subjects. A positive reaction was not obtained only with the isolate PLMVd-IVIA, which is the juice of an infected peach plant coated on a membrane for storing nucleic acids; this isolate has a very low concentration. At the same time, 2-step RT-PCR with the Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) reagent kit (Thermo Scientific) and with cDNA synthesized

Из двух испытанных форматов классической ПЦР преимущество имел 2-этапный формат. Установлено, что при проведении ПЦР в 2-этапном формате необходимо использовать кДНК, синтезированную с использованием обратного праймера cPLMVd. Для проведения ПЦР с этими праймерами наиболее целесообразно использовать наборы реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и «Screen Mix-HS» («Евроген») (табл. 2).

Наиболее оптимальные результаты в выявлении PLMVd методом классической ПЦР наблюдались в экспериментах с разработанными специалистами ФГБУ «ВНИИКР» праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»). Эти праймеры были разработаны с использованием программы Primer-BLAST к геному изолята PLMVd PL133A, выявленного на персике в Сербии и депонированного под номером EF151298 в GenBank NCBI. Анализ *in silico* показал комплементарность этих праймеров с геномом 360 изолятов PLMVd, депонированных в GenBank NCBI, и отсутствие комплементарности с геномом каких-либо нецелевых виридов. При реакции этих праймеров с геномом изолятов PLMVd амплифицируется продукт величиной 250–254 п. н.

Праймеры PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») были испытаны с шестью изолятами PLMVd в 1-этапном и 2-этапном форматах ОТ-ПЦР с наборами реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen) (для 1-этапного формата), «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific), «Screen Mix-HS» («Евроген») и «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат») (для 2-этапного формата). При этом 2 последних набора реагентов испытывали с кДНК, синтезированной двумя способами: набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) с праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈ и набором «MMLV RT Kit» («Евроген») с обратным праймером PLMVd-P4R.

По результатам исследования установлена возможность эффективного использования праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») при проведении ОТ-ПЦР как в 1-этапном, так и в 2-этапном форматах.

Режимы ОТ-ПЦР для использования праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R: обратная транскрипция – по методике производителя; амплификация: предварительная денатурация – 5 мин. при 95 °С, затем 40 циклов (95 °С – 30 сек., 60 °С – 45 сек., 72 °С – 60 сек.), финальная элонгация – 5 мин.

При проведении 2-этапной ОТ-ПЦР с наборами реагентов «Screen Mix-HS» («Евроген») и «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат») преимущество имело использование кДНК, синтезированной набором «MMLV RT Kit» («Евроген») с праймером PLMVd-P4R, по сравнению с использованием кДНК, синтезированной набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) и праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈. При использовании набора реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) наблюдалась низкая воспроизводимость результатов (табл. 3).

Таким образом, проведенные эксперименты показали высокую эффективность праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R, которые разработаны специалистами ФГБУ «ВНИИКР» и могут быть рекомендованы для тестирования подкарантинной

with the MMLV RT Kit (Evrogen) and reverse specific primer cPLMVd, made it possible to diagnose all 6 tested PLMVd isolates.

Similar results were obtained for the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) when the reaction was set up with the MMLV RT Kit (Evrogen) together with the 5x MasDD TaqMix-2025 PCR reaction mixture (Dialat).

In experiments with the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) and the Screen Mix-HS reagent kit (Evrogen), stable amplification of specific products was observed for five PLMVd isolates out of six subjects. In the experiment with cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) and the reverse primer cPLMVd, traces of the specific product were also observed for the sixth test isolate PLMVd – IVIA (Table 2).

In experiments with amplification reagent kits “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific) and “5x MasDD TaqMix-2025” (Dialat) and a set for reverse transcription “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific), along with specific ones, the formation of nonspecific amplification products was also observed (Fig. 1).

Thus, our studies have shown the possibility of diagnosing PLMVd using the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999). Of the two formats tested, classical PCR had the advantage of the 2-step format. It was found that when carrying out PCR in a 2-step format, it is necessary to use cDNA synthesized using the reverse primer cPLMVd. To carry out PCR with these primers, it is most advisable to use the Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) and Screen Mix-HS (Evrogen) reagent kits (Table 2).

The most optimal results in the detection of PLMVd by the classical PCR method were observed in experiments with the primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ ВНИИКР) developed by specialists from the VNIKР. These primers were designed using the Primer-BLAST program against the genome of the PLMVd PL133A isolate found in peach in Serbia and deposited under the number EF151298 at GenBank NCBI. *In silico* analysis showed the complementarity of these primers with the genome of 360 PLMVd isolates deposited in GenBank NCBI, and the absence of complementarity with the genome of any non-target viroids. When these primers react with the genome of PLMVd isolates, a product of 250–254 bp is amplified.

Primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB ФГБУ «ВНИИКР») were tested with six PLMVd isolates in 1-step and 2-step RT-PCR formats with OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) (for 1-stage format), Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), Screen Mix-HS (Evrogen) and 5x MasDD TaqMix-2025 (Dialat) (for 2-stage format). At the same time, the last 2 reagent kits were tested with cDNA synthesized by two methods: the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with the Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers and the MMLV RT Kit (Evrogen) with the reverse primer PLMVd-P4R.

Таблица 3
Итоговая таблица ОТ-ПЦР для праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R

Table 3
Summary table of RT-PCR for primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R

Изоляты Isolates	1-этапная ОТ-ПЦР	2-этапная ОТ-ПЦР										
	1-step RT-PCR	«Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix» (2X) (Thermo Scientific)			«Mas ^{DD} Mix-2025» («Диалат») (Dialat)			«Screen Mix-HS» («Евроген») (Evrogen)				
	«One step RT PCR» (Qiagen)	Обратная транскрипция Reverse transcription										
		«First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific)	«MMLV RT Kit» («Евроген») (Evrogen)			«First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific)	«MMLV RT Kit» («Евроген») (Evrogen)			«First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific)	«MMLV RT Kit» («Евроген») (Evrogen)	
		Праймеры для ОТ RT primers			Праймеры для ОТ RT primers			Праймеры для ОТ RT primers				
Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈		Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	PLMVd-P4R	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	PLMVd-P4R	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	PLMVd-P4R			
PLMVd PC-1134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Magn-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Pyt-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Pyt-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Pyt-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
PLMVd-IVIA	+	+	±	+	+	±	+	-	±	+		
ASSVd PC-1136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PBCVd PC-1135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PSTVd PV-0860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CSVd PV-0735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

продукции на наличие PLMVd. Данные праймеры возможно использовать как в 1-этапном формате ОТ-ПЦР набором реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen), так и в 2-этапном формате с различными наборами реагентов, из которых преимущество имеют наборы «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат»), «Screen Mix-HS» («Евроген»). При проведении ОТ-ПЦР в 2-этапном формате необходимо использовать кДНК, синтезированную наборами «MMLV RT Kit» («Евроген») с обратным праймером PLMVd-P4R. Результаты некоторых экспериментов с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R представлены на рис. 2.

Чувствительность тестов с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») оценивали на примере двух изолятов вириода – PLMVd PC-1134 и Magn-1. Выделение РНК проводили наборами «Проба-НК» («АгроДиагностика») и «Фито-Сорб-М» («Синтол»). Для постановки ПЦР в 1-этапном формате использовали набор реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen). Для ПЦР в 2-этапном формате для обратной транскрипции применяли «MMLV RT Kit» («Евроген») с обратным праймером PLMVd-P4R, для амплификации – «Screen Mix-HS» («Евроген»).

При проведении ОТ-ПЦР в 1-этапном формате с набором реагентов «OneStep RT-PCR Kit» четкий положительный сигнал для изолята PLMVd PC-1134

According to the results of the study, the possibility of effective use of primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIKIR”) was established when carrying out RT-PCR in both 1-step and 2-step formats.

RT-PCR modes for using primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R: reverse transcription – according to the manufacturer’s method; amplification: preliminary denaturation – 5 min. at 95 °C, then 40 cycles (95 °C – 30 sec., 60 °C – 45 sec., 72 °C – 60 sec.), final elongation – 5 min.

When carrying out a 2-step RT-PCR with the Screen Mix-HS (Evrogen) and 5x Mas^{DD} TaqMix-2025 (Dialat) reagent kits, the advantage was given to the use of cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) with the PLMVd-P4R primer, compared to using the cDNA synthesized by the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and the Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers. When using a set of reagents “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific), low reproducibility of results was observed (Table 3).

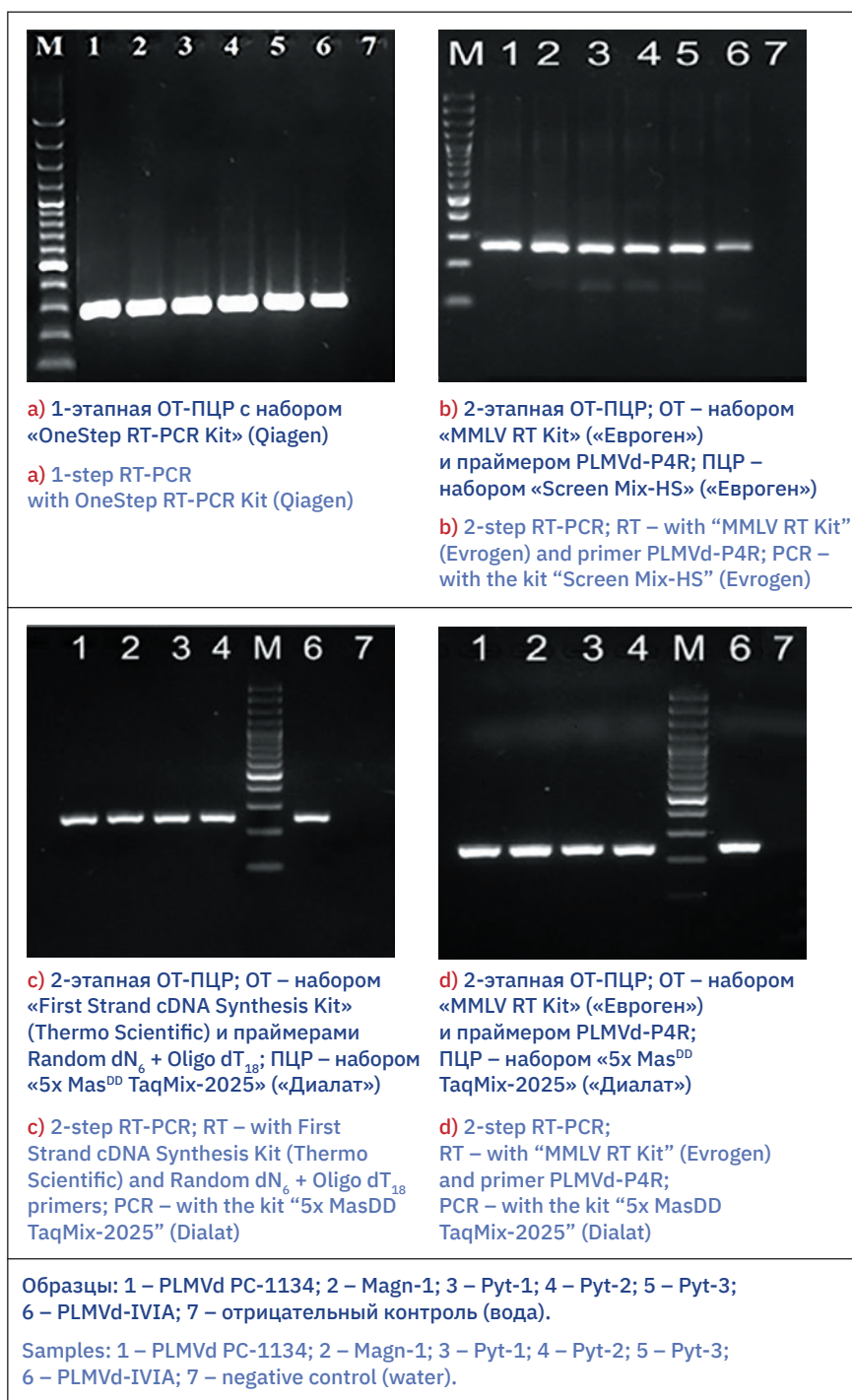


Рис. 2. Результаты некоторых экспериментов с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»)

Fig. 2. Results of some experiments with primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIIKR”)

вне зависимости от используемых наборов для выделения РНК наблюдался при разведении экстрактов сока в 10⁻³ включительно (рис. 3), а для изолята PLMVd Magn-1 – при разведении в 10⁻² включительно.

При проведении ПЦР в 2-этапном формате с набором реагентов «Screen Mix-HS» («Евроген») для обоих изолятов вириода положительный сигнал наблюдался при разведении в 10⁻³ после использования для выделения РНК набора «Фитосорб-М» («Синтол») и в 10⁻² – после использования набора «Проба-НК» («АгроДиагностика»).

Для выявления PLMVd методом ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего

Thus, the experiments carried out showed the high efficiency of the PLMVd-P3F/PLMVd-P4R primers, which were developed by the specialists of VNIKIR and can be recommended for testing regulated products for the presence of PLMVd. These primers can be used both in a 1-step RT-PCR format with the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) and in a 2-step format with various reagent kits, of which the 5x MasDD TaqMix-2025 (Dialat) and “Screen Mix-HS” (Evrogen) have an advantage. When carrying out RT-PCR in a 2-step format, it is necessary to use the cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) with the reverse primer PLMVd-P4R. The results of some experiments with the PLMVd-P3F/PLMVd-P4R primers are shown in Fig. 2.

The sensitivity of tests with primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIKIR”) was assessed using the example of two viroid isolates – PLMVd PC-1134 and Magn-1. Isolation of RNA was carried out with the sets “PREP-NA” (AgroDiagnostica) and “Fito-Sorb-M” (Synthol). To set up PCR in a 1-step format, a OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) was used. For PCR in a 2-step format, the MMLV RT Kit (Evrogen) with the reverse primer PLMVd-P4R was used for reverse transcription, and Screen Mix-HS (Evrogen) was used for amplification.

When carrying out RT-PCR in a 1-step format with the OneStep RT-PCR Kit, a clear positive signal for the PLMVd PC-1134 isolate, regardless of the kits used for RNA isolation, was observed at a dilution of juice extracts of 10⁻³ inclusive (Fig. 3), and for isolate PLMVd Magn-1 – at a dilution of 10⁻² inclusive.

When PCR was carried out in a 2-step format with a set of reagents “Screen Mix-HS” (Evrogen) for both viroid isolates, a positive signal was observed at a dilution of 10⁻³ after using the kit “Fitosorb-M” (Synthol) and at 10⁻² – after using the set “PREP-NA” (AgroDiagnostica).

To detect PLMVd by real-time PCR in the presence of the SYBR Green intercalating dye, the IB-Fw/IB-Rev primers were tested (Boubourakas et al., 2011). It was found that these primers are most expedient to use with the SuperScript III Platinum SYBR Green one-step

красителя SYBR Green проведено испытание праймеров IB-Fw/IB-Rev (I. Boubourakas et al., 2011). Установлено, что эти праймеры наиболее целесообразно использовать с наборами реагентов «SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qPCR kit with ROX» (Invitrogen) в 1-этапном формате ОТ-ПЦР-PB или «qPCRMix-HS SYBR + High ROX» («Евроген») в 2-этапном формате. Для 2-этапного формата необходим предварительный синтез кДНК с набором для обратной транскрипции «MMLV RT Kit» («Евроген») и обратным специфическим праймером IB-Rev.

Проведена оптимизация тестов «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика»).

При оценке специфичности данного набора не было отмечено неспецифической реакции с референтными изолятами нецелевых виридов: ASSVd, CSVd, PBCVd и PSTVd.

Установлено, что для постановки ПЦР набором «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») в равной степени эффективно использование кДНК, синтезированной набором для обратной транскрипции «MMLV RT Kit» («Евроген») с праймерами Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇ или набором для обратной транскрипции «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика») с праймером OT-Random. Несколько худшие результаты были получены для кДНК, синтезированной набором для обратной транскрипции «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) с праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈ (рис. 4).

Положительные сигналы для изолята PLMVd-IVIA наблюдались на очень высоком пороговом цикле – 40,0–40,3. Выявление пяти остальных изолятов достигалось на пороговых циклах от 26,6 до 37,5. Для выявления изолятов PC-1134, Pwt-1 и Pwt-2 преимущество имела кДНК, синтезированная набором «MMLV RT Kit», а для изолятов Magn-1 и Pwt-3 – кДНК, синтезированная набором «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика»).

Установлено, что чувствительность выявления изолятов целевого объекта набора для ПЦР-PB к PLMVd «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») варьирует от 10⁰ до 10⁻² в зависимости от способов выделения РНК и вариантов проведения обратной транскрипции. В образцах с кДНК, синтезированной набором «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика») и праймером OT-Random, чувствительность составила 10⁻² для РНК обоих испытуемых изолятов вирида, PLMVd PC-1134 и Magn-1, выделенной набором «Проба-НК» («АгроДиагностика»). При использовании для выделения РНК набора «ФитоСорб-М» («Синтол») чувствительность выявления изолята PLMVd PC-1134 составила 10⁻¹, а изолята Magn-1 – 10⁰. В тестах с кДНК, синтезированной набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и праймерами Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇, чувствительность выявления изолята PLMVd PC-1134 составила 10⁻² и 10⁻¹ для РНК, выделенной наборами «Проба-НК» («АгроДиагностика») и «ФитоСорб-М» («Синтол») соответственно. На чувствительность выявления изолята Magn-1, которая составила 10⁻¹, вариант выделения РНК не оказывал существенного влияния.

qPCR kit with ROX (Invitrogen) in 1-step RT-PCR-RT format or qPCRMix-HS SYBR + High ROX (Evrogen) in a 2-stage format. For the 2-step format, preliminary cDNA synthesis is required with a reverse transcription kit “MMLV RT Kit” (Evrogen) and a reverse specific primer IB-Rev.

Optimization of the tests “Set of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostica) was carried out.

When assessing the specificity of this kit, no nonspecific reaction with reference isolates of non-target viroids was noted: ASSVd, CSVd, PBCVd and PSTVd.

It has been established that for PCR with the kit “Kit of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostica), it is equally effective to use cDNA synthesized by the kit for reverse transcription “MMLV RT Kit” (Evrogen) with primers Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇ or reverse transcription kit “Reagent kit for reverse transcription” (AgroDiagnostica) with primer OT-Random. Somewhat worse results were obtained for cDNA synthesized by the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with the Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers (Fig. 4).

Positive signals for isolate PLMVd-IVIA were observed at a very high threshold cycle of 40.0–40.3.

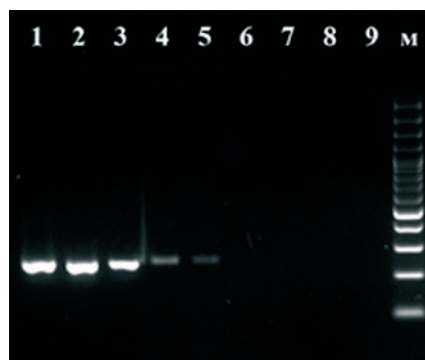


Рис. 3. Определение чувствительности выявления PLMVd методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R.

Выделение РНК – набором «ФитоСорб-М» («Синтол»), ОТ-ПЦР – набором «OneStep RT-PCR» (Qiagen) и праймерами PLMVd-P3F PLMVd-P4R.

Образцы: 1 – PLMVd PC-1134 (концентрация – 32,7 нг/мкл); 2 – PLMVd PC-1134/1:10; 3 – PLMVd PC-1134/1:100; 4 – PLMVd PC-1134/1:1000; 5 – PLMVd PC-1134/1:10000; 6 – PLMVd PC-1134/1:100000; 7 – PLMVd PC-1134/1:1000000; 8 – PLMVd PC-1134/1:10000000; 9 – отрицательный контроль.

Fig. 3. Determination of the sensitivity of detection of PLMVd by RT-PCR using primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R.

Isolation of RNA – with the kit “PhytoSorb-M” (Synthol), RT-PCR – with the kit “OneStep RT-PCR” (Qiagen) and primers PLMVd-P3F PLMVd-P4R.

Samples: 1 – PLMVd PC-1134 (concentration – 32.7 ng/μl); 2 – PLMVd PC-1134/1:10; 3 – PLMVd PC-1134/1:100; 4 – PLMVd PC-1134/1:1000; 5 – PLMVd PC-1134/1:10000; 6 – PLMVd PC-1134/1:100000; 7 – PLMVd PC-1134/1:1000000; 8 – PLMVd PC-1134/1:10000000; 9 – negative control.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Результат
A1	PLMVd-PC1134_OT – («АгроДиагностика»)	34,4	30,2	+
A2	Magn-1_OT – («АгроДиагностика»)	31,0	29,8	+
A3	Pyt-1_OT – («АгроДиагностика»)	31,6	33,7	+
A4	Pyt-2_OT – («АгроДиагностика»)	33,5	31,8	+
A5	Pyt-3_OT – («АгроДиагностика»)	33,3	31,5	+
A6	PLMVd-IVIA_OT – («АгроДиагностика»)	40,3	31,2	+
A7	PLMVd- PC1134_OT – MMLV RT Kit	29,4	29,7	+
A8	Magn-1_OT – MMLV RT Kit	32,5	30,3	+
B1	Pyt-1_OT – MMLV RT Kit	26,6	30,6	+
B2	Pyt-2_OT – MMLV RT Kit	33,2	31,0	+
B3	Pyt-3_OT – MMLV RT Kit	35,5	30,6	+
B4	PLMVd IVIA_OT – MMLV RT Kit	40,0	30,9	+
B5	PLMVd- PC1134_OT – First Strand cDNA Synthesis	32,0	30,2	+
B6	Magn-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	35,6	30,8	+
B7	Pyt-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	28,3	31,0	+
B8	Pyt-2_OT – First Strand cDNA Synthesis	34,8	31,3	+
C1	Pyt-3_OT – First Strand cDNA Synthesis	37,5	31,2	+
C2	PLMVd-IVIA_OT – First Strand cDNA Synthesis		30,9	–
C3	K–		31,1	–
C4	K+	28,4	31,0	+

Рис. 4. Влияние трех вариантов проведения обратной транскрипции на эффективность выявления изолятов PLMVd набором «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» для ПЦР-РВ к PLMVd («АгроДиагностика»)

Hole number	Tube ID	Cp, Fam	Cp, Hex	Result
A1	PLMVd-PC1134_OT – (AgroDiagnostics)	34.4	30.2	+
A2	Magn-1_OT – (AgroDiagnostics)	31.0	29.8	+
A3	Pyt-1_OT – (AgroDiagnostics)	31.6	33.7	+
A4	Pyt-2_OT – (AgroDiagnostics)	33.5	31.8	+
A5	Pyt-3_OT – (AgroDiagnostics)	33.3	31.5	+
A6	PLMVd-IVIA_OT – (AgroDiagnostics)	40.3	31.2	+
A7	PLMVd- PC1134_OT – MMLV RT Kit	29.4	29.7	+
A8	Magn-1_OT – MMLV RT Kit	32.5	30.3	+
B1	Pyt-1_OT – MMLV RT Kit	26.6	30.6	+
B2	Pyt-2_OT – MMLV RT Kit	33.2	31.0	+
B3	Pyt-3_OT – MMLV RT Kit	35.5	30.6	+
B4	PLMVd IVIA_OT – MMLV RT Kit	40.0	30.9	+
B5	PLMVd- PC1134_OT – First Strand cDNA Synthesis	32.0	30.2	+
B6	Magn-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	35.6	30.8	+
B7	Pyt-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	28.3	31.0	+
B8	Pyt-2_OT – First Strand cDNA Synthesis	34.8	31.3	+
C1	Pyt-3_OT – First Strand cDNA Synthesis	37.5	31.2	+
C2	PLMVd-IVIA_OT – First Strand cDNA Synthesis		30.9	–
C3	K–		31.1	–
C4	K+	28.4	31.0	+

Fig. 4. Influence of three variants of reverse transcription on the efficiency of detecting PLMVd isolates using the kit “Kit of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus” for PCR-RT to PLMVd (AgroDiagnostics)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты позволяют рекомендовать «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации к-ДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») для проведения скрининговых тестов на наличие PLMVd.

С использованием скринингового теста с «Комплектом реагентов для ПЦР-амплификации к-ДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») и подтверждающего теста методом классической ПЦР с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»), 2 изолята PLMVd выявлены в образцах подкарантинной продукции, отобранных в ходе предотгрузочных обследований в питомниках Италии.

The detection of the remaining five isolates was achieved at threshold cycles from 26.6 to 37.5. To identify isolates PC-1134, Pyt-1, and Pyt-2, the cDNA synthesized with the MMLV RT Kit had an advantage, and for isolates Magn-1 and Pyt-3, the cDNA synthesized with the Reverse Transcription Reagent Kit (AgroDiagnostics).

It has been established that the sensitivity of detecting isolates of the target object of the RT-PCR kit to PLMVd “Kit of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostics) varies from 10⁰ to 10⁻² depending on the methods of RNA isolation and options for performing reverse transcriptions. In samples with cDNA synthesized by the kit “Reagent kit for reverse transcription” (AgroDiagnostics) and the primer OT-Random, the sensitivity was 10⁻² for the RNA of both tested viroid isolates, PLMVd PC-1134 and Magn-1, isolated by the kit “Sample-NK” (AgroDiagnostics). When using the kit “FitoSorb-M” (Synthol) for RNA isolation, the detection sensitivity of the PLMVd PC-1134 isolate was 10⁻¹, and the Magn-1 isolate – 10⁰. In tests with cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) and primers Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇, the detection sensitivity of the PLMVd isolate PC-1134 was 10⁻² and 10⁻¹ for RNA isolated with the PREP-NA (AgroDiagnostics) and FitoSorb-M (Synthol) respectively. The detection sensitivity of the Magn-1 isolate, which was 10⁻¹, was not significantly affected by the RNA isolation option.

CONCLUSION

The experiments carried out make it possible to recommend the “Set of reagents for PCR amplification of c-DNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostics) for screening tests for the presence of PLMVd.

Using a screening test with the “Kit of reagents for PCR amplification of c-DNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostics) and a confirmation test by the method of classical PCR with primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIKCR”), 2 isolates PLMVd detected in samples of regulated products taken during pre-shipment surveys in nurseries in Italy.

В процессе проведенных исследований обработана диагностика вириода латентной мозаики персика, основанная на использовании различных модификаций полимеразной цепной реакции. Таким образом, описанные в статье исследования легли в основу разработанных впервые в Российской Федерации методических рекомендаций по выявлению и идентификации этого патогена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R., 1998. Genomic structure of three phenotypically different isolates of Latent mosaic viroid: Implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi species. – *Journal of Virology*, 72: 7397–7406.
2. Boubourakas I.N., Voloudakis A.E., Fasseas K., Resnick N., Koltai H., Kyriakopoulou P.E., 2011. Cellular localization of Peach latent mosaic viroid in peach sections by liquid phase in situ RT-PCR. – *Plant Pathology*, 60: 468–473.
3. Loreti S., Faggioli F., Cardoni M., Mordenti G., Babini A.R., Poggi Pollini C., Barba M., 1999. Comparison of different diagnostic methods for detection of Peach latent mosaic viroid. – *Bulletin OEPP/EPPO*, 29: 433–438.
4. Luigi M., Faggioli F., 2011. Development of quantitative real-time PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. – *Eur. J. Plant Pathol.*, 130: 109–116.
5. Shamloul A.M., Minafra A., Hadidi A., Giunchedi L., Waterworth H.E., Allam E.K., 1995. Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequencing of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. – *Acta Horticulturae*, 386: 522–530.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru.

Живаева Татьяна Степановна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru.

Лозовая Евгения Николаевна, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: evgeniyaf@mail.ru.

Шнейдер Юрий Андреевич, кандидат биологических наук, начальник научно-методического и экспериментального центра, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Каримова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

In the course of the research carried out, the diagnostics of the PLMVd was developed, based on the use of various PCR modifications. Thus, the studies described in the article formed the basis for the methodological recommendations for the detection and identification of this pathogen developed for the first time in the Russian Federation.

REFERENCES

1. Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R. Genomic structure of three phenotypically different isolates of Latent mosaic viroid: Implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi species. *Journal of Virology*, 1998; 72: 7397–7406.
2. Boubourakas I.N., Voloudakis A.E., Fasseas K., Resnick N., Koltai H., Kyriakopoulou P.E. Cellular localization of Peach latent mosaic viroid in peach sections by liquid phase in situ RT-PCR. *Plant Pathology*, 2011; 60: 468–473.
3. Loreti S., Faggioli F., Cardoni M., Mordenti G., Babini A.R., Poggi Pollini C., Barba M. Comparison of different diagnostic methods for detection of Peach latent mosaic viroid. *Bulletin OEPP/EPPO*, 1999; 29: 433–438.
4. Luigi M., Faggioli F. Development of quantitative real-time PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2011; 130: 109–116.
5. Shamloul A.M., Minafra A., Hadidi A., Giunchedi L., Waterworth H.E., Allam E.K. Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequencing of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Horticulturae*, 1995; 386: 522–530.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuri Prikhodko, PhD in Agriculture, leading researcher, Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru.

Tatiana Zhivaeva, researcher, Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru.

Evgeniya Lozovaya, researcher, Postgraduate Studies Department, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: evgeniyaf@mail.ru.

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology and Experimental Center, Leading Researcher, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Elena Karimova, PhD in Biology, Head of Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.