



Convention on
Biological Diversity



Обнаружение патогенов растений методом ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией

*5-ти дневный теоретический и практический
учебный семинар по лабораторной идентификации
видов, скринингу живых измененных организмов и
обнаружению патогенов растений*

г. Минск, 12-16 февраля 2024 г.

Младший научный сотрудник Национального
координационного центра биобезопасности
Института генетики и цитологии НАН Беларуси

Остапчик Виктория

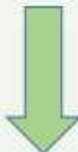
Detection of plant pathogens using real-time PCR with reverse transcription

*Theoretical and Practical Training Workshop
on Laboratory Identification of Species,
Screening of Living Modified Organisms and Detection of
Plant Pathogens
Minsk, February 12 - 16, 2024*


Minsk, February 12-16, 2024

Junior researcher at the National Coordination
Biosafety Center
Institute of Genetics and Cytology NAS of
Belarus
Ostapchik Viktoria

Обеспечение продовольственной безопасности

- Значительную долю в продовольственном обеспечении многих стран играет **импорт** продуктов питания.
 - Поступление импортной сельскохозяйственной продукции сопряжено с **угрозой ввоза и распространения** на территории страны карантинных вредителей, болезней и сорных растений, которые могут нанести огромный экономический вред.
- 
- Четкая, чувствительная и своевременная **диагностика карантинных фитопатогенов** с целью предотвращения их проникновения и распространения на территории любой страны-импортера при осуществлении мер по внешнему и внутреннему карантину растений является **важной задачей**.

Providing food security

- Food **imports** take a significant part in the food supply of many countries.
 - The arrival of imported agricultural products is associated with the **risk of importation and spread of quarantine pests, diseases and weeds** on the territory of the country that may cause great economic damage.
- 
- **Accurate, sensitive and timely diagnosis of quarantine phytopathogens** to prevent their entry and spread within the territory of any importing country in the implementation of external and internal plant quarantine measures **is an important challenge**.

Виды болезней сельскохозяйственных культур и их возбудители

Заболевания растений



Инфекционные

- вызваны биотическими факторами (патогенами)

Неинфекционные

- вызваны абиотическими факторами

Types of crop diseases and their pathogens

Plant diseases



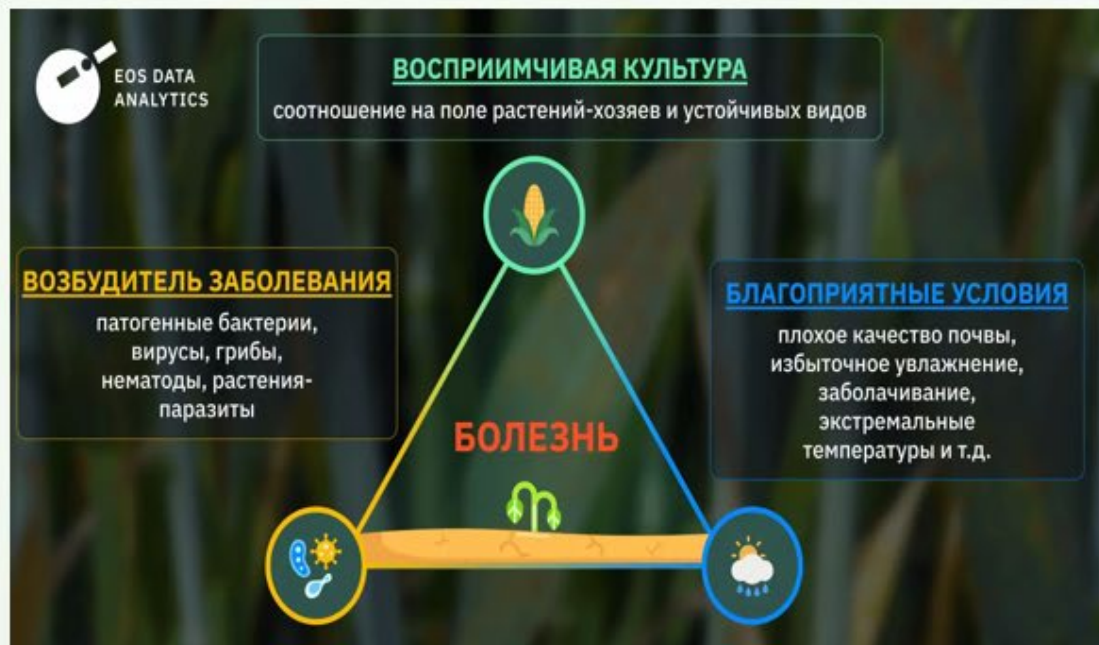
Infectious

- caused by biotic factors (pathogens)

Non-infectious

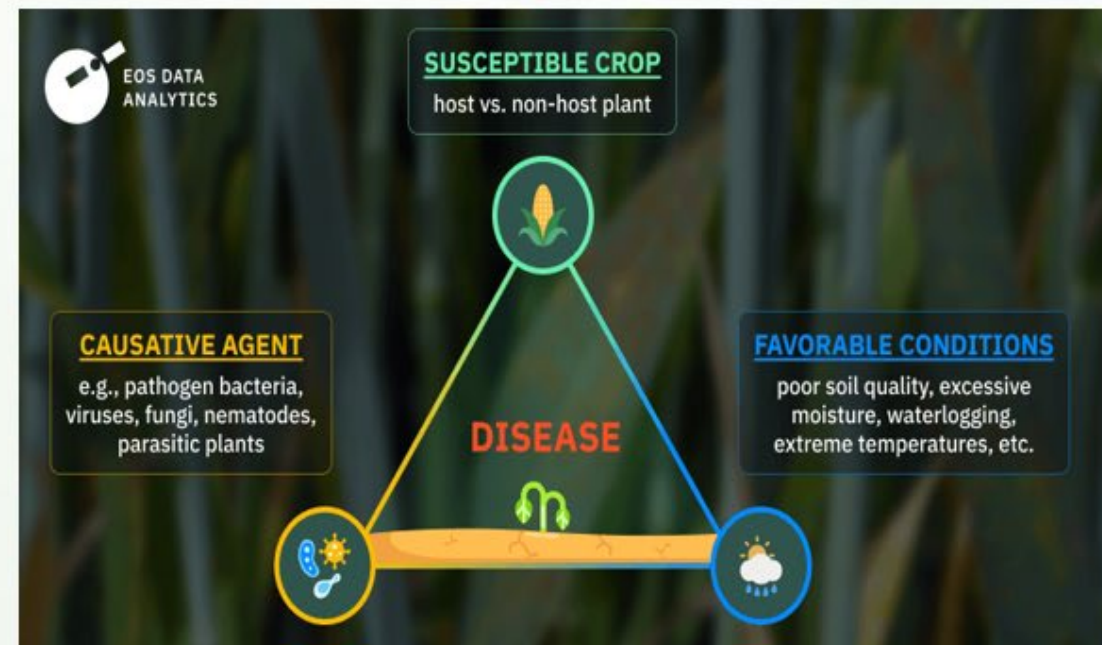
- caused by abiotic factors

Чем опасны инфекционные болезни растений?



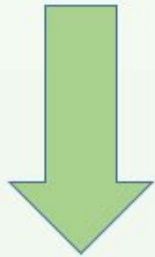
- **Диагностика** инфекционных болезней культур **сложнее**, по сравнению с болезнями, вызванными абиотическими факторами.
- **Распространение** инфекционной болезни растений происходит **быстро**.
- Распространение возможно при наличии **благоприятных условий** и растений, **восприимчивых** к возбудителю заболевания.

What are the dangers of infectious plant diseases?



- **Detection** of infectious crop diseases is **more difficult** than diseases caused by abiotic factors.
- **The spread** of an infectious plant disease is **rapid**.
- Spread is possible if there are **favorable conditions** and plants are **susceptible** to the pathogen.

Возбудители инфекционных болезней



Бактерии

Грибы

Вирусы

Нематоды

**Растения-
паразиты**

Causative agents of infectious diseases



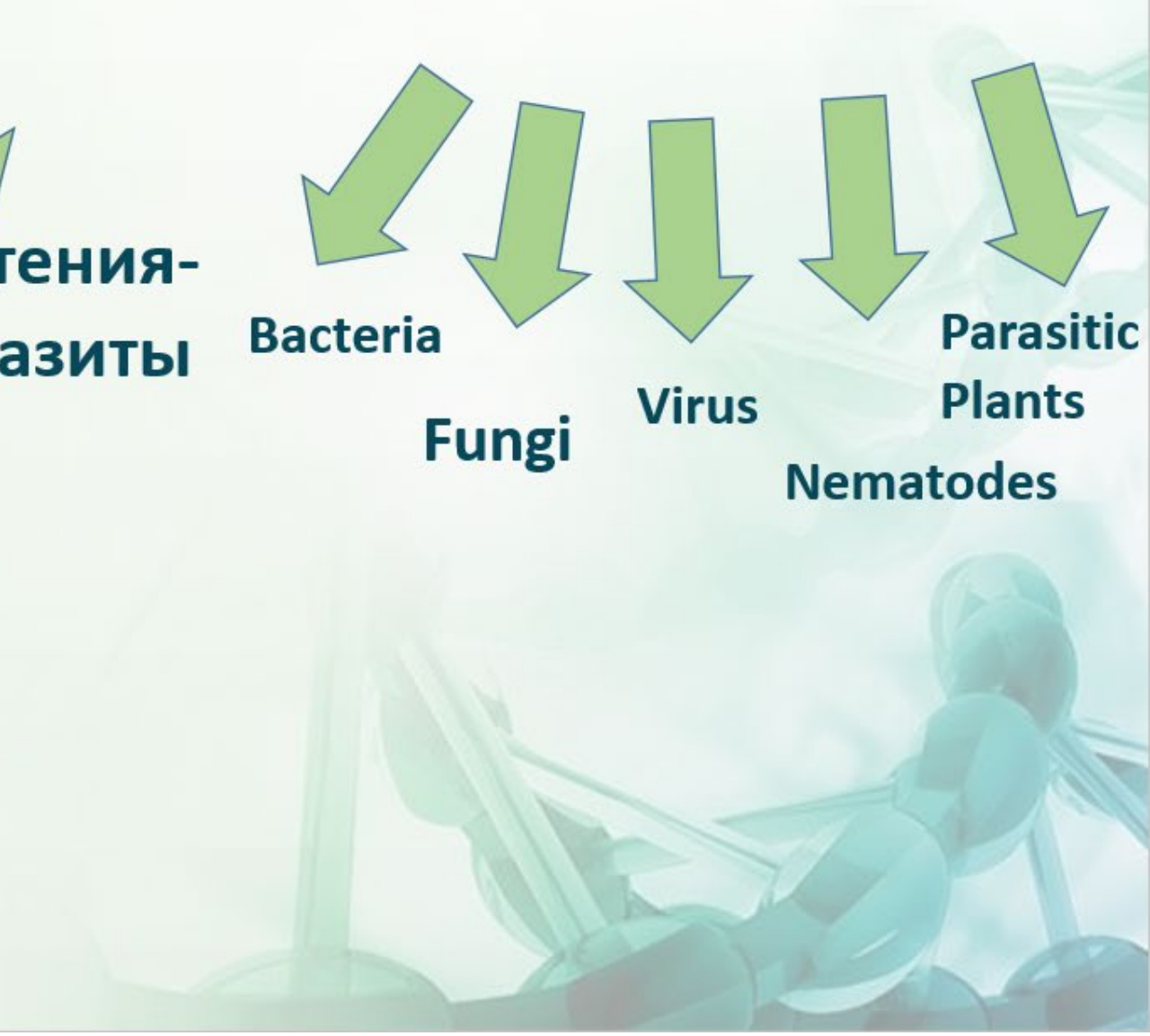
Bacteria

Fungi

Virus

Nematodes

**Parasitic
Plants**



ПЦР и ее модификации

PCR and its modifications

- Прямая (Direct PCR)
- С обратной транскрипцией ОТ-ПЦР (RT-PCR)
- Вложенная (NESTED PCR)
- Изотермическая петлевая амплификация (LAMP PCR)
- FLASHПЦР (FLASH-PCR)
- ПЦР в реальном времени (Real time – RQ-PCR)
- Матричный микрочиповый ПЦР (MICROCHIP PCR)
- Мультипраймерная ПЦР (MULTIPLEX PCR, MULTIPRIMER PCR)
- Цифровая ПЦР (DIGITAL PCR, dPCR)
- Секвенирования следующего поколения (NGS).

Преимущества – специфичность и высокая чувствительность, позволяющие поставить точный диагноз при минимальных концентрациях возбудителей, возможность проводить количественную оценку присутствия фитопатогена в некоторых модификациях ПЦР.

Advantages - specificity and high sensitivity, allowing accurate detection at minimal pathogen concentrations, ability to quantify the presence of phytopathogen in some modifications of PCR.

Вирусы и вироиды Viruses and viroids

Пасленовые
Solanaceae



Tomato ringspot nepovirus

Tomato brown rugose fruit virus

Tomato yellow leaf curl begomovirus

Tomato spotted wilt virus

Pepino mosaic virus

Картофель
Potato



Andean potato latent tymovirus

Potato yellow vein crinivirus

Potato spindle tuber viroid

Potato yellowing alfamovirus

Potato virus T

Chrysanthemum stem necrosis tospovirus

Chrysanthemum stunt pospoviroid

Potato black ringspot nepovirus

Raspberry ringspot nepovirus

Potato yellowing alfamovirus

Plum pox potyvirus

Andean potato mottle comovirus

Peach latent mosaic viroid

Peach rosette mosaic nepovirus

Цветы
Flowers



Ягодные кустарники
Berry bushes



Cherry rasp leaf cheravirus

Косточковые
Drupaceae



Вирус мозаики пепино (Pepino mosaic virus) PepMV

- Род Potexvirus сем Flexiviridae.
- Геном – одноцепочечная молекула РНК.
- Высокая контагиозность, способен передаваться механически (вовремя уходных работ; различными видами насекомых, в том числе и опылителями; от растения к растению при их соприкосновении). В меньшей степени способен передаваться через семена.
- Экономически значимые растения-хозяева – томаты, картофель, баклажаны и пепино (дынная груша или сладкий огурец).
- The genus Potexvirus of the family Flexiviridae.
- The genome is a single-stranded RNA molecule.
- Highly contagious, capable of mechanical transmission (during cultivation; by various insect species, including pollinators; from plant to plant by contact). To a lesser extent, it can be transmitted through seeds.
- Economically important host plants are tomatoes, potatoes, eggplants and pepino (melon pear or sweet cucumber).



Вирус мозаики пепино (Pepino mosaic virus) PepMV

На сегодняшний день эффективного средства борьбы с мозаикой пепино не существует. Единственными мерами против распространения этого заболевания являются профилактика и фитосанитарный контроль (идентификация патогена возможна только в лабораторных условиях)

To this day, there is no effective means of controlling pepino mosaic virus. The only measures against the spread of this disease are prevention and phytosanitary control (pathogen identification is only possible with laboratory tests)

Вирус мозаики пепино (Pepino mosaic virus) PePMV

Включен в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза и регулируемых некарантинных вредных организмов Европейского Союза (Union regulated non-quarantine pests, RNQP).

Included in the Single list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union and Union regulated non-quarantine pests (RNQP)

Вирусы и вирионы

<i>Andean potato latent tymovirus</i>	Андийский латентный тимовирус картофеля
<i>Andean potato mottle comovirus</i>	Андийский комовирус крапчатости картофеля
<i>Cherry rasp leaf cheravirus</i>	Черавирус рашилевидности листьев черешни
<i>Chrysanthemum stem necrosis tospovirus</i>	Тосповирус некроза побегов хризантемы
<i>Chrysanthemum stunt pospoviroid</i>	Вирион карликовости хризантем
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	Вирион латентной мозаики персика
<i>Peach rosette mosaic nepovirus</i>	Неповирус розеточной мозаики персика
<i>Pepino mosaic virus</i>	Вирус мозаики пепино
<i>Potato black ringspot nepovirus</i>	Неповирус черной кольцевой пятнистости картофеля
<i>Potato virus T</i>	Вирус Т картофеля

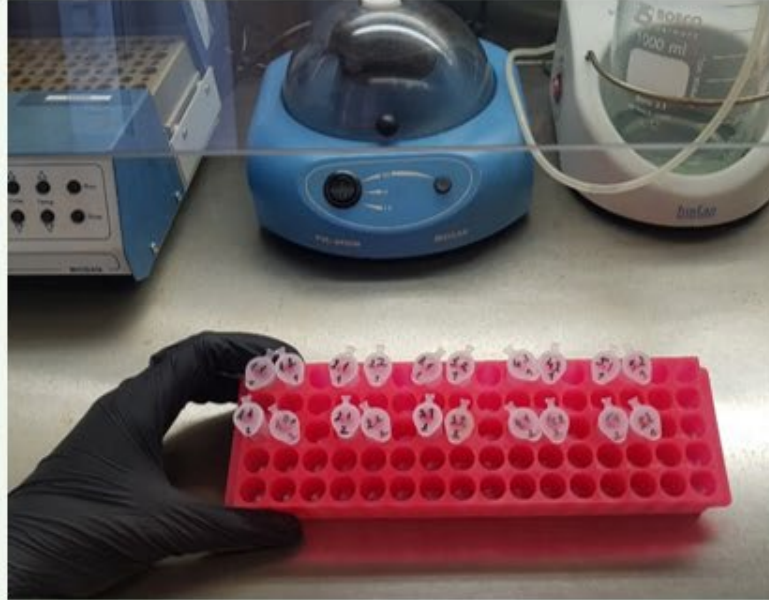
Viruses, viroids, virus-like diseases and phytoplasmas

RNQPs or symptoms caused by RNQPs	Plants for planting (genus or species)	Threshold for the vegetable seed concerned
Pepino mosaic virus [PEPMV0]	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	0 %
Potato spindle tuber viroid [PSTVD0]	<i>Capsicum annuum</i> L., <i>Solanum lycopersicum</i> L.	0 %

https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj

Этапы обнаружения фитопатогенов молекулярно-генетическими методами

1. Пробоподготовка;
2. Экстракция НК;
3. Обнаружение фитопатогенов выбранным молекулярно-генетическим методом.

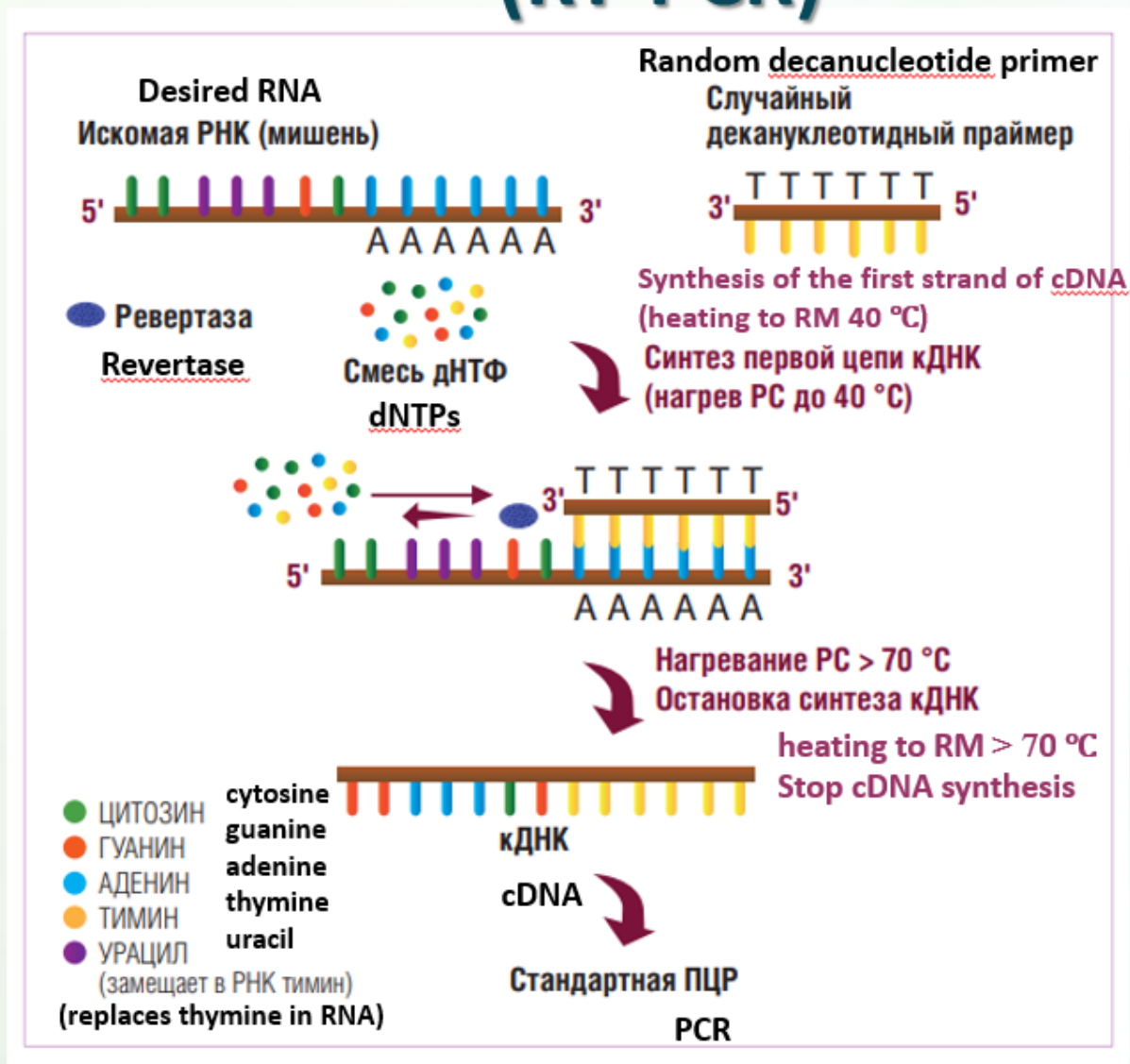


Stages of phytopathogen detection using molecular genetic methods

1. Sample preparation;
2. Extraction of NA;
3. Detection of phytopathogens using the selected molecular genetic method.

ПЦР с обратной транскрипцией Reverse transcription PCR (ОТ-ПЦР, RT-PCR)

- ОТ-ПЦР широко используется для выявления вирусов, геном которых представлен РНК
- Суть реакции – синтез двухцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК.
- Обратная транскриптаза (ревертаза)
- RT-PCR is commonly used to detect viruses with RNA in their genome
- The aim of the reaction is the synthesis of double-stranded DNA on a matrix of single-stranded RNA.
- Reverse transcriptase (revertase)



**Полимеразная цепная реакция
в режиме реального времени (ПЦР-РВ)
Real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR)**

Polymerase chain reaction
(PCR)

clideo.com

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR)

- Ограничения: фермент термоллабилен (температура не выше 42 °C), РНК образуют вторичные структуры
- Использование термостабильной полимеразы с полимеразной и транскриптазной активностью в присутствии ионов Mn^{2+} .

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

- Limitations: the enzyme is thermolabile (temperature not higher than 42 °C), RNA produces secondary structures
- Using thermostable polymerase with polymerase and transcriptase activity in the presence of Mn^{2+} ions.

ТНПА в области фитосанитарной экспертизы

- Закон Республики Беларусь от 25.12.2005 № 77-3 (ред. от 18.07.2016) «О карантине и защите растений»
- Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 28.12.2016 № 45 «Инструкция о порядке проведения карантинной фитосанитарной экспертизы подкарантинной продукции»
- Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 28 декабря 2016 г. № 45 «Об утверждении некоторых нормативных правовых актов в области карантина растений»
- Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 30 июля 2010 г. № 1140 «О некоторых вопросах карантина и защиты растений»
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 157

Technical regulatory legal acts in the phytosanitary inspection

- Law of the Republic of Belarus of 25.12.2005 № 77-3 (ed. of 18.07.2016) "On quarantine and plant protection"
- Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus from 28.12.2016 № 45 "Instruction on the order of quarantine phytosanitary inspection of regulated products"
- Resolution of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus of December 28, 2016 № 45 "On approval of some normative legal acts on plant quarantine"
- Resolution of the Council of Ministers of the Republic of Belarus of July 30, 2010 № 1140 "On some issues of plant quarantine and protection"
- Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 30, 2016 № 157

<p style="text-align: center;">Область применения The area of application</p>	<p style="text-align: center;">ТНПА Technical regulatory legal acts</p>
<p style="text-align: center;">термины и определения понятий в области карантина растений terms and definitions of concepts in the field of plant quarantine</p>	<p style="text-align: center;">ГОСТ 20562-2013 КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. Термины и определения GOST 20562-2013 PLANT QUARANTINE. Terms and definitions</p>
<p style="text-align: center;"><u>подкарантинная</u> продукция (продукция растительного происхождения, лесоматериалы, упаковочные и крепежные материалы и др.) regulated products (products of plant origin, timber, packing and fastening materials, etc.)</p>	<p style="text-align: center;">ГОСТ 12430-2019 КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. Методы и нормы отбора образцов <u>подкарантинной</u> продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях GOST 12430-2019 PLANT QUARANTINE. Methods and standards of sampling of regulated products at quarantine <u>phytosanitary</u> inspection and laboratory tests</p>
<p style="text-align: center;">насекомых и клещей, образцы <u>подкарантинной</u> продукции в соответствии с 4.1, а также на средства для привлечения и отлова насекомых и клещей insects and mites, samples of regulated products in accordance with 4.1 and also on means for attracting and catching insects and mites</p>	<p style="text-align: center;">ГОСТ 28420—2022 КАРАНТИН РАСТЕНИЙ Правила подготовки лабораторных проб при энтомологических исследованиях GOST 28420-2022 PLANT QUARANTINE Rules for preparation of laboratory samples for entomological research</p>
<p style="text-align: center;">сорные растения и их части (семена, плоды или соплодия), а также на образцы <u>подкарантинной</u> продукции в соответствии с 4.1 weed plants and their parts (seeds, fruits or covepods), and also on samples of regulated products according to 4.1</p>	<p style="text-align: center;">ГОСТ 34892-2022 Карантин растений. Правила подготовки лабораторных проб при <u>герботологических</u> исследованиях GOST 34892-2022 Plant quarantine. Rules for preparation of laboratory samples for <u>herbological</u> tests</p>
<p style="text-align: center;">растения картофеля <i>Solarium <u>tuberosum</u> Linnaeus</i> potato plants <i>Solarium <u>tuberosum</u> Linnaeus</i></p>	<p style="text-align: center;">ГОСТ 33539-2015 Карантин растений. Методы выявления и идентификации вируса Т картофеля GOST 33539-2015 Plant quarantine. Methods of detection and identification of potato virus T</p>
<p style="text-align: center;">плодовые косточковые культуры рода <i>Prunus</i> (далее — растения) stone fruit cultures of the genus <i>Prunus</i> (hereinafter - plants).</p>	<p style="text-align: center;">ГОСТ 33505-2015 Карантин растений. Методы выявления и идентификации <u>потивируса шарки</u> слив GOST 33505-2015 Plant quarantine. Methods of detection and identification of Plum Pox <u>potivirus</u></p>



С перечнем заболеваний растений можно ознакомиться по ссылке: <https://www.genbitgroup.com/ru/phytopathogens/>

A list of plant diseases can be found at: <https://www.genbitgroup.com/ru/phytopathogens/>

Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза

Single list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union

УТВЕРЖДЕН
Решением Совета
Евразийской экономической комиссии
от 30 ноября 2016 г. № 158

ЕДИННЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ
карантинных объектов Евразийского экономического союза

Список изменяющих документов
(в ред. Решений Совета Евразийской экономической комиссии от 30.03.2018 № 25,
от 08.08.2019 № 74, от 18.05.2021 № 54, от 15.07.2022 № 108, от 25.01.2023 № 8)

Перечень подкарантинной продукции (подкарантинных грузов, подкарантинных материалов, подкарантинных товаров), подлежащей карантинному фитосанитарному контролю (надзору) на таможенной границе Таможенного союза и таможенной территории Таможенного союза

УТВЕРЖДЕН
Решением Комиссии таможенного союза
от 18 июня 2010г. № 318
(в редакции Решения Комиссии
таможенного союза
от 18 ноября 2010г. № 454)

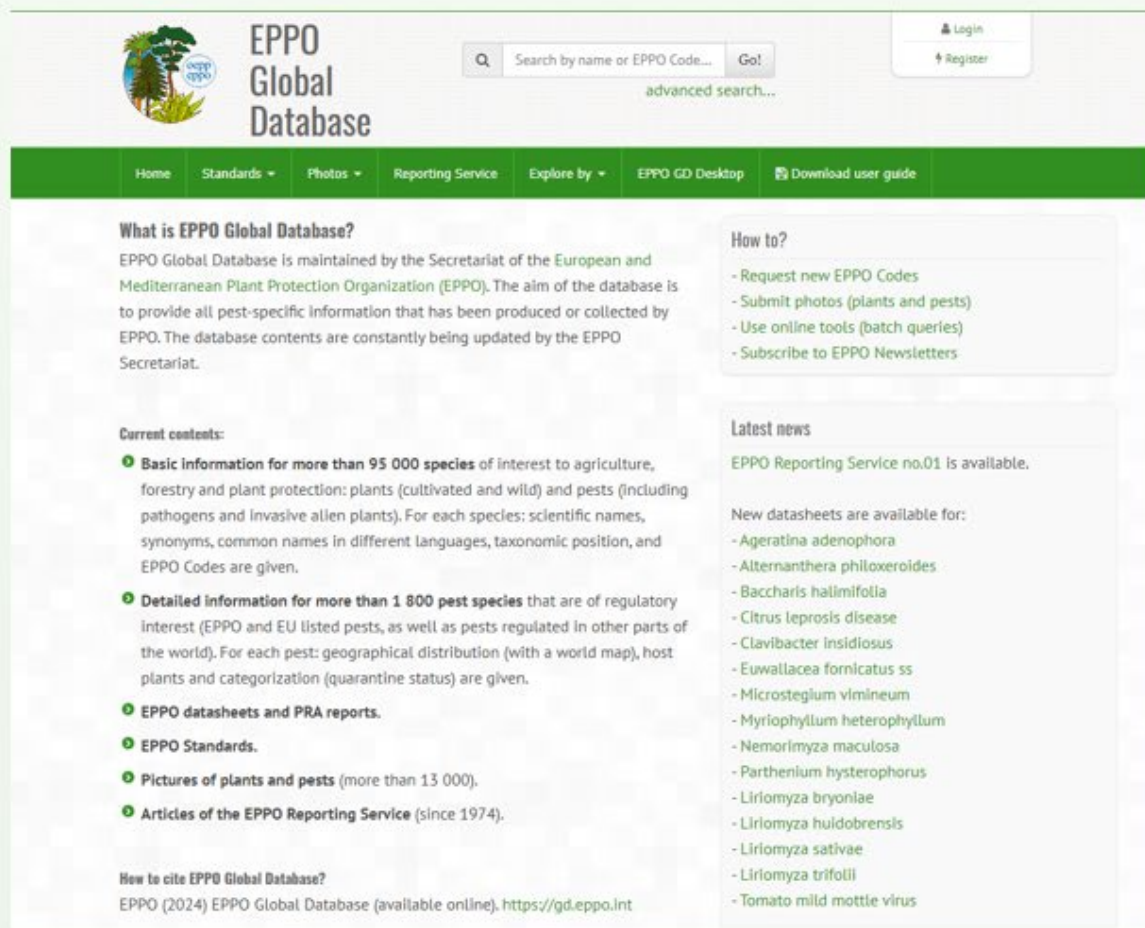
ПЕРЕЧЕНЬ
подкарантинной продукции (подкарантинных грузов, подкарантинных материалов, подкарантинных товаров), подлежащей карантинному фитосанитарному контролю (надзору) на таможенной границе Таможенного союза и таможенной территории Таможенного союза

Наименование	Код ТН ВЭД ТС *
I. Подкарантинная продукция (подкарантинные грузы, подкарантинные материалы, подкарантинные товары) с высоким фитосанитарным риском	
Клещи, нематоды и насекомые живые для научно-исследовательских целей	0106 90 001 0
Луковички, клубни, клубневидные корни, клубнелуковички, корневища, включая разветвленные, находящиеся в состоянии вегетативного покоя, вегетации, или цветения; растения и корни шкворня, кроме корней, товарной позиции 1212	0601

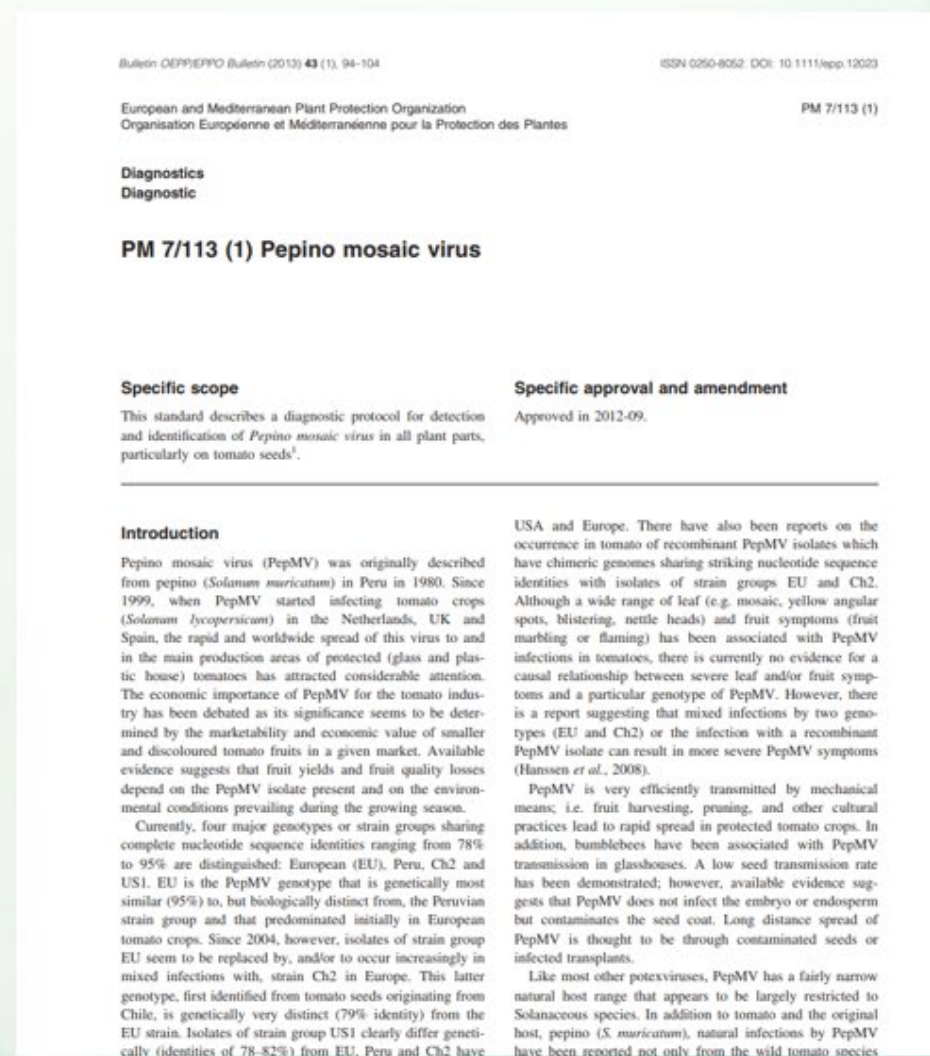
List of regulated products (regulated cargoes, regulated materials, regulated goods), subject to quarantine phytosanitary inspection (supervision) on customs border of the Customs Union and customs territory of the Customs Union

Стандарты Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (ЕОКЗР)

Standards of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)



The screenshot shows the EPPO Global Database website. At the top left is the EPPO logo and the text 'EPPO Global Database'. To the right is a search bar with the text 'Search by name or EPPO Code...' and a 'Go!' button. Below the search bar is a navigation menu with items: Home, Standards, Photos, Reporting Service, Explore by, EPPO GD Desktop, and Download user guide. The main content area is divided into several sections: 'What is EPPO Global Database?' with a brief description; 'How to?' with a list of actions like 'Request new EPPO Codes' and 'Submit photos'; 'Current contents:' with a list of key features like 'Basic information for more than 95 000 species'; 'Latest news' with a recent update about the EPPO Reporting Service; and 'How to cite EPPO Global Database?' with the URL 'https://gd.eppo.int'.



The screenshot shows the EPPO standard page for PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus. At the top, it displays the Bulletin information: 'Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013) 43 (1), 94-104' and the ISSN '0250-8052'. The page title is 'PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus'. Below the title, there are sections for 'Diagnostics', 'Specific scope', and 'Introduction'. The 'Specific scope' section describes the diagnostic protocol for detection and identification of *Pepino mosaic virus* in all plant parts, particularly on tomato seeds. The 'Introduction' section provides background on the virus, its discovery in Peru in 1980, and its spread to Europe. It mentions that the virus is transmitted mechanically and that there are reports of its occurrence in tomato in the USA and Europe. The page also includes a 'Specific approval and amendment' section stating it was approved in 2012-09.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

THANKS FOR YOUR ATTENTION!

