ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 72618— 2026

Биотехнология

ОЦЕНКА ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НАСАЖДЕНИЙ И РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным бюджетным учреждением «Российский центр защиты леса» (ФБУ «Рослесозащита»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 апреля 2026 г. № 355-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.rst.gov.ru)

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2026

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Общие положения 6
5 Отбор образцов 8
5.1 Требования к проведению отбора образцов посадочного материала и древесных растений из насаждений, биоматериала из почв, энтомовредителей для выявления фитозаболеваний путем проведения генетического анализа (общий подход) 9
5.2 Отбор образцов семенного материала лесных растений для проведения молекулярно-генетического анализа 9
5.3 Отбор образцов из лесных питомников для проведения молекулярно-генетического анализа 10
5.4 Отбор образцов биоматериала (хвоя, листья, стебель, древесина, корни, генеративные органы, плодовые тела грибов) в естественных насаждениях и лесных культурах для проведения молекулярно-генетического анализа 11
5.5 Отбор образцов материала энтомовредителей и продуктов их жизнедеятельности из семян, питомников, лесных культур, естественных насаждений для проведения молекулярно-генетического анализа 12
5.6 Маркировка, транспортирование и хранение образцов 13
5.7 Получение чистой культуры (посев и изоляция на питательную среду) 16
5.8 Оценка степени зараженности репродуктивного материала по результатам использования методов ДНК-анализа 17
6 Требования к условиям проведения исследований 17
6.1 Требования к персоналу (квалификации сотрудников) 17
6.2 Требования безопасности и к охране окружающей среды 17
6.3 Требования к стерильности проведения молекулярно-генетических тестов 18
7 Оборудование, специализированная посуда, расходные материалы и реактивы для молекулярно-генетической диагностики 18
8 Порядок проведения ДНК-исследования 20
8.1 Подготовка к проведению анализа: регистрация, стерилизация 20
8.2 Подготовка аналитических проб растительного материала 21
8.3 Выделение ДНК 21
8.4 Видовая идентификация 22
8.5 Секвенирование биологического материала на генетическом анализаторе 27
8.6 Получение, оформление и интерпретация результатов исследований (сравнительный анализ в базах данных) 29
Приложение А (рекомендуемое) Шкала категорий санитарного состояния деревьев 30
Приложение Б (рекомендуемое) Буферы, растворы и питательные среды 32
Приложение В (справочное) Проведение капиллярного электрофореза с использованием генетических анализаторов 33
Приложение Г (справочное) Порядок проведения видовой идентификации 35
Приложение Д (справочное) Формы (бланки) заключений по результатам обследования деревьев лесных пород, объектов лесного семеноводства, партий репродуктивного материала, почвы на зараженность фитопатогенными организмами с использованием метода молекулярно-генетического анализа 45
Библиография 48

Введение

Методы молекулярно-генетического анализа направлены на выявление наличия ДНК фитопатогенов грибной и бактериальной природы у древесных растений, определение видовой/родовой принадлежности возбудителей заболеваний посадочного материала в лесных питомниках и древесных растений в лесных насаждениях молекулярно-генетическими методами.

Методы молекулярно-генетического анализа позволяют проводить точную видовую/родовую диагностику, при определении фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, устанавливать взаимосвязи между наблюдаемыми фактами и полученными результатами обследования.

Применяемые методы позволяют использовать ДНК-анализ для точной диагностики заболеваний на всех стадиях развития для образцов: репродуктивного материала (семена, плоды, генеративные органы); посадочного материала в лесных питомниках; древесной/кустарниковой растительности в насаждениях; насекомых-вредителей с целью определения возбудителей заболеваний, приводящих к гибели растений.

Определяемый показатель — микробиота, присутствующая в партиях семян, на посадочном материале в лесных питомниках и древесных породах в лесных насаждениях (в т. ч. фитопатогены), энтомовредители, выявленные при выполнении ДНК-анализов и идентифицированные до вида.

Применение методов молекулярно-генетического анализа для определения возбудителей заболеваний в репродуктивном материале (семена, плоды), на посадочном материале лесных питомников и в насаждениях может быть использовано для своевременного и обоснованного принятия управленческих решений по их защите.

Результаты видовой/родовой идентификации, патогенной и иной микрофлоры или вредителей, полученные при выполнении ДНК-анализов, и другие сведения о проанализированных образцах формируют массив генетических данных.

Таким образом, методы молекулярно-генетического анализа обеспечивают:

- контроль фитопатологического состояния семян, сеянцев и саженцев в лесных питомниках, древесных растений в лесных насаждениях, мониторинг развития очагов вредителей леса;
- определение видовой принадлежности фитопатогенов семян, сеянцев в целях проведения необходимых мер профилактики и устранения заболеваний;
- формирование массива генетических данных (референсной базы).

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биотехнология

ОЦЕНКА ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НАСАЖДЕНИЙ И РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Biotechnology.
Methods for assessing the phytosanitary status of planting material and plantations of forest tree species using laboratory DNA diagnostics

Дата введения — 2026—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к проведению работ по ДНК-анализу микрофлоры в образцах репродуктивного материала лесных пород, насекомых-вредителей — потенциальных переносчиков грибной и бактериальной микрофлоры, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Дополнительно возможно определение видовой/родовой принадлежности патогенной микрофлоры в образцах обследуемого материала, а также насекомых-вредителей.

Настоящий стандарт описывает методы оценки фитопатологического состояния семян, посевного/посадочного материала и насаждений лесных древесных пород с использованием ДНК-анализа (далее — методы).

Методы, описываемые настоящим стандартом, рекомендуются для применения в области работ, связанных с оценкой фитопатологического состояния посадочного материала и древесных растений лесных пород, распространяются на отбор проб (образцов) семян лесных пород, посадочного материала, древесных растений лесных пород, вредителей и устанавливают условия и критерии к отбору, транспортированию, хранению образцов для диагностики фитопатогенов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.103 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ 12.4.253 (EN 166:2002) Система стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты глаз и лица. Общие технические требования

ГОСТ 12430—2019 Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях

ГОСТ 13056.1—67 Семена деревьев и кустарников. Отбор образцов

Издание официальное

ГОСТ 13056.5 Семена деревьев и кустарников. Методы фитопатологического анализа
ГОСТ Р 54653—2011 Удобрения органические. Методы микробиологического анализа

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **агароза:** Полисахарид, полученный из морских водорослей и являющийся составной частью агара.

Примечание — Используется как гелевая среда в хроматографии и электрофорезе.

3.1.2

аллель: Одно из возможных альтернативных структурных состояний (форм) гена или участка ДНК конкретной локализации.

Примечание — Аллели, как правило, отличаются последовательностями нуклеотидов.

[Адаптировано из ГОСТ 34833—2022, статья 1]

3.1.3

ампликон: Нуклеотидная последовательность ДНК, размноженная с помощью ПЦР.
[ГОСТ 34833—2022, статья 2]

Примечание — Используется взаимозаменяемо с общепринятыми лабораторными терминами, такими как «продукт ПЦР».

3.1.4

амплификация: Процесс накопления копий определенной нуклеотидной последовательности во время полимеразной цепной реакции.
[ГОСТ 34833—2022, статья 3]

Примечание — Под амплификацией также понимают увеличение числа копий фрагмента ДНК.

3.1.5 **ассимиляционный аппарат растения:** Части растения, участвующие в фотосинтезе, имеющие, как правило, зеленую окраску (хвоя, листва, зеленые части побегов).

3.1.6 **болезни лесных древесных пород:** Нарушение обмена веществ у растений под влиянием патогенных организмов или неблагоприятных условий среды обитания, приводящее к преждевременной гибели растения или повреждению отдельных его органов.

3.1.7 **биоматериалы:** Ткань, жидкость живого организма или субстанция, производимая им, многочисленная и разнообразная категория.

Примечание — К ним относятся: пиломатериалы, солома, хлопок, шерсть, пчелиный воск, птичий пух, шкуры животных. С точки зрения как массы, так и общей значимости, незаменимости, основным является дерево.

3.1.8

гаплотип: Комбинация связанных друг с другом аллелей на одной хромосоме индивидуума.
[ГОСТ 34833—2022, статья 10]

3.1.9 **гель:** Поддерживающая среда для электрофореза, обладающая свойствами молекулярного сита.

Примечание — Гели именуют в зависимости от главного компонента, используемого для его приготовления, например агарозный или полиакриламидный.

3.1.10 **геном:** Совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма.

3.1.11 **генотип:** Совокупность всех генов (аллелей) отдельной особи, взаимодействующих между собой.

Примечание — Также под генотипом понимается генетическая структура организма по одному или нескольким изучаемым генным локусам.

3.1.12 **Государственный лесопатологический мониторинг;** ГЛПМ: Система наблюдений за санитарным и лесопатологическим состоянием лесов, а также за происходящими в них процессами и явлениями.

3.1.13 **Государственный мониторинг воспроизводства лесов;** ГМВЛ: Система наблюдений за состоянием лесов, требующих воспроизводства, и лесов, в которых проводится их воспроизводство, а также анализа, оценки и прогноза изменения их состояния.

3.1.14

денатурация (плавление): Процесс нарушения нативной конформации биологических макромолекул в результате разрыва нековалентных связей, индуцируемый химическими веществами, нагреванием, охлаждением и т. п. и сопровождающийся потерей биологической активности.
[ГОСТ 34833—2022, статья 26]

3.1.15 **дезоксирибонуклеиновая кислота;** ДНК (матрица): Биологический полимер, молекула которого построена из двух спиральных полинуклеотидных цепей, являющийся материальным носителем наследственности.

3.1.16 **ДНК-маркер:** Фрагмент ДНК, используемый в качестве признака и доступный для анализа молекулярно-биологическими методами.

3.1.17

ДНК-полимераза: Фермент, катализирующий процесс синтеза полинуклеотидной цепи ДНК из отдельных нуклеотидов при использовании другой цепи в качестве матрицы, а также ДНК-затравки.
[ГОСТ 34833—2022, статья 28]

3.1.18 **изолят:** Чистая культура определенного вида бактерий и грибов, выделенная из биологического образца.

Примечание — Выделенный вариант патогена (или непатогенного микроорганизма) с характерными свойствами, отличающими его от стандартного штамма данной бактерии или гриба или от штамма, выделенного в предыдущий период времени.

3.1.19

лесные культуры: Лесные насаждения, созданные посевом или посадкой.
[ГОСТ 17559—82, статья 1]

3.1.20

лесной посадочный материал: Древесные растения или их части, предназначенные для посадки на лесокультурной площади, в лесном питомнике и (или) для озеленения.
[ГОСТ 17559—82, статья 11]

Примечание — Используется для проведения ДНК-анализа.

3.1.21

лесной посадочный материал с открытой корневой системой: Лесной посадочный материал с освобожденной от почвы или покрывающего субстрата корневой системой.

[ГОСТ 17559—82, статья 13]

3.1.22

лесной посадочный материал с закрытой корневой системой: Лесной посадочный материал с корневой системой, находящейся внутри кома почвы, брикета или емкости с субстратом.

[ГОСТ 17559—82, статья 14]

3.1.23

локус: Определенный участок ДНК на хромосоме.

[ГОСТ 34833—2022, статья 38]

Примечание — Как правило, используется вместо термина «ген» или фрагмента ДНК с установленной локализацией.

3.1.24 **маркер молекулярной массы:** Набор фрагментов ДНК известной длины.

Примечание — Используется в качестве калибровочной шкалы для определения размера анализируемых в ходе электрофореза зон.

3.1.25 **нуклеотид:** Наименьшая структурная единица полимерных молекул РНК и ДНК.

Примечание — Представляет собой сложное органическое соединение, в состав которого входят молекулы одного из азотистых оснований, пентозного сахара и остатков фосфорной кислоты.

3.1.26 **образец биоматериала:** Часть растения, участвующая в фотосинтезе (хвоя, листья, зеленые части побегов), древесина, проростки семян, ткани насекомых, микроорганизмов или субстанция, ими производимая.

3.1.27 **отжиг:** Стадия в ПЦР, когда цепи ДНК образца разошлись, температура понижается, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей.

Примечание — Также — этап цикла ПЦР, во время которого происходит соединение праймеров с комплементарными участками одноцепочечной ДНК-матрицы.

3.1.28 **пара нуклеотидов;** п.н.: Элементарная единица полимерной двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, состоящая из двух нуклеотидов, соединенных между собой через фосфатную группу.

Примечание — П.н. — также единица измерения размера/длины гена, сайта, хромосомы, генома. Допускается использовать термин «пара оснований», п.о.

3.1.29

полимеразная цепная реакция: Ферментативная реакция, позволяющая амплифицировать ДНК *in vitro*.

[ГОСТ Р 52833—2007 (ИСО 22174:2005), пункт 3.4.1]

Примечание — Процесс амплификации *in vitro* — процесс многократного образования копий целевого фрагмента ДНК, как правило, содержащих определенные гены, в котором их количество возрастает в два в *n*-й степени раз, где *n* — число циклов реакции. Инициируется синтетическими олигонуклеотидными праймерами.

3.1.30

полиморфизм: Наличие нескольких аллельных форм отдельных генов и участков ДНК (генотипически и фенотипически отличающихся форм признака).

[Адаптировано из ГОСТ 34833—2022, статья 52]

3.1.31

праймер: Короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, являющийся синтетическим олигонуклеотидом, который применяется в полимеразной цепной реакции и при секвенировании ДНК для начала синтеза и обозначения границ фрагмента ДНК, подлежащего амплификации.

[ГОСТ 34833—2022, статья 55]

3.1.32 **референсная база данных генетического материала возбудителей заболеваний и энтомопатогенов:** Автоматизированная аналитическая информационно-поисковая система генетической идентификации, позволяющая хранить и обрабатывать генетическую информацию о биологических объектах — специализированные ресурсы, предоставляющие стандартизированные данные для анализа в определенной предметной области.

3.1.33

секвенирование: Определение последовательности оснований — нуклеотидов молекул ДНК/РНК.

[Адаптировано из ГОСТ 34833—2022, статья 58]

3.1.34

стандартный лесной посадочный материал: Лесной посадочный материал, отвечающий требованиям нормативно-технической документации по стандартизации.

[ГОСТ 17559—82, статья 12]

3.1.35 **Taq-полимераза:** Термостабильная полимераза, полученная из бактерии Termus aquaticus или с помощью генной инженерии на основе Taq-полимеразы «дикого» типа.

3.1.36 **фенотип:** Проявление свойств организма, зависящих от его генотипа и факторов окружающей среды.

3.1.37 **фитопатоген:** Микроорганизм, вызывающий, в определенных условиях, заболевание растения.

3.1.38 **фитопатология:** Наука о болезнях растений, их причинах и мерах борьбы с ними.

3.1.39 **экссудат:** Выделение жидкости из пораженных тканей дерева.

3.1.40 **электрофорез:** Техника разделения, очистки и детекции макромолекул, основанная на различии скоростей их движения под воздействием электрического поля за счет направленного перемещения заряженных частиц в дисперсионной среде.

3.1.41 **элонгация:** Удлинение нуклеотидной цепи при проведении ПЦР путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

3.1.42 **энтомовредители:** Насекомые, которые повреждают различные части, органы и ткани растений: хвое- и листогрызущие — вредители листвы и хвои здоровых растений (первичные); стволовые — заселяют ослабленные, больные и поврежденные деревья (вторичные); корневые — почвообитающие; конобионты — личинки которых развиваются за счет репродуктивных органов древесных пород (почек, завязей, шишек, плодов, семян).

3.1.43 **этидиум бромид (бромистый этидий):** Флуоресцентный краситель, способный интеркалировать (встраиваться) между парами оснований двухнитчатой ДНК и РНК.

Примечание — Комплекс нуклеиновой кислоты с красителем флуоресцирует под УФ-светом. В молекулярной биологии применяется для выявления нуклеиновых кислот в процессе электрофореза ДНК в агарозном геле.

3.1.44 **mQ-(mili-Q-) вода:** Вода, очищенная от органических веществ, токсинов микроорганизмов и неорганических ионов с помощью ионообменной смолы и мембранных фильтров.

Примечание — mQ-(mili-Q-) вода 1-го типа (см. [1]) обладает содержанием общего органического углерода не более 50 мкг/л. Ее чистота, определяемая по электропроводности/сопротивлению, тем выше, чем меньше в воде ионов, то есть чем больше сопротивление. Как правило, добиваются значения более 18,2 МОм/см (при 25 °С). В конце очистки вода фильтруется от микроорганизмов (мембранный фильтр 0,22 мкм) (см. [2]).

3.1.45 **ddH_2O:** Вода, прошедшая двойную дистилляцию, то есть очищенная от примесей путем двух циклов испарения и конденсации.

3.1.46 **Дезоксирибонуклеозидтрифосфат;** дНТФ (dNTP): Нуклеотид— дезоксирибоза и три фосфатные группы — строительный блок ДНК.

Примечание — Набор нуклеотидов необходим для синтеза ДНК в клетках и при проведении ПЦР.

3.1.47 **ддНТФ (ddNTP):** Дидезоксинуклеозидтрифосфаты или дидезоксинуклеотиды — ингибиторы удлинения цепи ДНК, используемые при секвенировании ДНК.

3.2 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

АК — архив клонов;
ЗКС — закрытая корневая система;
ЛСП — лесосеменная плантация;
ОКС — открытая корневая система;
ОЛС — объекты лесного семеноводства;
ПААГ — полиакриламидный гель;
ПСА — персульфат аммония;
ПО — программное обеспечение;
СПЦР — секвенирующая ПЦР;
ТРИС (TRIS) — трис(гидрокси-метил) аминометан [Tris (hydroxymethyl) aminomethane];
ЦТАБ (CTAB) — цетил(триметиламмоний) бромид;
dH2O — дистиллированная вода;
ЭДТА (EDTA) — этилендиаминтетрауксусная кислота (тетрауксусная кислота);
TAE — Трис-ацетат-ЭДТА/Трис-ацетатный буфер (Tris-acetat-EDTA buffer);
TBE — Трис-борат-ЭДТА/Трис-боратный буфер (Tris-borate-EDTA buffer);
TEMED — тетраметилендиамин (N, N, N`, N`- tetramethylenediamine).

4 Общие положения

4.1 Выполнение установленных настоящим стандартом требований обеспечивает реализацию задач в рамках мониторинга санитарного и лесопатологического состояния лесных насаждений, а также мониторинга воспроизводства лесов, по исследованию и защите лесов от вредителей и болезней, озеленению объектов и т. п. с использованием методов молекулярно-генетического анализа.

4.2 Оценку фитопатологического состояния древесных растений и репродуктивного материала лесных древесных пород методом ДНК-анализа проводят в целях:

- точной идентификации насекомых-вредителей и насекомых — переносчиков заболеваний лесных растений на всех стадиях их развития;
- оценки наличия фитопатогенной микрофлоры, способной вызывать заболевания лесных пород, в почвах, на которых растения произрастают; в имаго стволовых вредителей, способных переносить грибную и бактериальную инфекцию;
- контроля фитопатологического состояния семян, сеянцев и саженцев в питомниках;
- формирования массива генетических данных патогенных организмов (референсной базы).

4.3 Результаты исследования применяют для систематизации и предоставления сведений при проведении оценки фитопатологического состояния лесов, питомников, объектов лесного семеноводства, репродуктивного материала с использованием метода молекулярно-генетического анализа.

4.4 При оценке результатов фитопатологического состояния древесных растений из насаждений в референсную базу генетических данных вносят информацию:

- о географических данных мест отбора и количествах собранных и обследованных образцов (географические координаты, название обследуемых субъектов Российской Федерации, лесничеств, участковых лесничеств или лесных участков, номера кварталов, выделов);
- наименованиях возбудителей заболеваний, насекомых-вредителей и насекомых — переносчиков заболеваний лесных растений, выявленных в лесных насаждениях и объектах лесного семеноводства методом молекулярно-генетического анализа.

4.5 При оценке результатов фитопатологического состояния репродуктивного материала (семена, сеянцы, саженцы) с использованием метода ДНК-диагностики в базу генетических данных вносят информацию:

- о наименованиях, количествах, доле зараженности партии в процентах, частоте встречаемости выявленных возбудителей бактериальной или грибной микрофлоры, названиях вызываемых ими заболеваний;

- площади обследованных пораженных участков по результатам проведенных анализов.

4.6 По итогам проведенных с использованием метода ДНК-диагностики обследований видового состава микрофлоры с образцов сеянцев/саженцев из питомников, образцов микрофлоры с древесных растений из лесных насаждений, с ОЛС, с репродуктивного материала и энтомовредителей проводят:

- анализ результатов видового состава выявленной патогенной микробиоты;

- описание выявленных характерных фитопатогенов с определением частоты встречаемости выявленных патогенов;

- фитопатологическую оценку объектов, обследованных методами молекулярно-генетического анализа лесных древесных насаждений, питомников, ОЛС, репродуктивного материала;

- подготовку выводов, предложений и необходимых рекомендаций, имеющих практическую значимость.

4.7 Порядок выполнения работ по выявлению (определению) комплекса микроорганизмов на посевном/посадочном материале в лесных питомниках и на древесных растениях в насаждениях методом ДНК-анализа может быть проведен с применением двух взаимодополняющих подходов.

Описание способов приведено в таблице 1.

Таблица 1 — Два подхода определения видового состава микробиоты

Номер этапа	Видоспецифическая ПЦР-диагностика микробиоты с использованием видоспецифических праймеров	Способ сиквенсового определения микробиоты на генетическом анализаторе с использованием универсальных праймеров
1	Отбор, транспортирование и хранение нативных образцов (проб)	Отбор, транспортирование и хранение нативных образцов (проб)
2	Пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов (проб) биоматериала, определение чистоты и концентрации суммарной ДНК, доведение до нужной концентрации	Пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов биоматериала (проб), определение чистоты и концентрации суммарной ДНК, доведение ее раствора до нужной концентрации
3	Проведение ПЦР с видоспецифическими праймерами. Горизонтальный форез с гельдокументированием в УФ-спектре	Проведение ПЦР с универсальными праймерами. Горизонтальный форез с гельдокументированием в УФ-спектре
4	Интерпретация результатов — визуальная оценка фореграмм для подтверждения наличия/отсутствия предполагаемого вида микробиоты	Вырезка и очистка ампликонов. Секвенирующая ПЦР. Очистка смеси. Секвенирование
5	—	Интерпретация результатов — идентификация секвенированных последовательностей по генетической базе данных NCBI с использованием сервиса BLAST

I — диагностика на основе амплификации с использованием видоспецифических праймеров для подтверждения наличия или отсутствия основных наиболее часто встречающихся фитопатогенов.

Процесс проведения молекулярно-генетической диагностики с применением видоспецифических праймеров состоит из следующих этапов:

- 1 этап — проведение работ по отбору, транспортированию и хранению биоматериала образцов (проб);

- 2 этап — пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов биоматериала (проб), определение чистоты и концентрации суммарной ДНК;

- 3 этап — проведение ПЦР с видоспецифическими праймерами, с последующей детекцией наличия/отсутствия ПЦР-продуктов в агарозном геле (электрофорез) и фотодокументированием;

- 4 этап — интерпретация результатов — проводится анализ фореграмм путем визуальной оценки, статистической обработки и документирования.

II — диагностика доминирующих видов микрофлоры путем определения нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК с использованием универсальных праймеров на генетическом анализаторе и последующей идентификацией видов микробиоты в генетической базе данных.

ПЦР-диагностика с универсальными праймерами путем секвенирования позволяет выявить видовой состав исключительно доминирующей микрофлоры в образце, что не всегда приводит к идентификации болезнетворных или наиболее вредоносных патогенов, присутствующих в низкой концентрации. В данном случае ПЦР с видоспецифическими праймерами может проводиться дополнительно для выявления видов возбудителей наиболее опасных болезней.

Таким образом, видоспецифическая диагностика микробиоты с использованием специфических праймеров проводится и как самостоятельное определение, подтверждающее присутствие определенных видов/родов микробиоты, и как дополнительное, уточняющее результаты сиквенсового определения.

Процесс молекулярно-генетической диагностики — определение видов микробиоты с помощью универсальных праймеров и получения нуклеотидной последовательности на генетическом анализаторе (секвенирование) сводится к выполнению следующих этапов:

- 1 этап — проведение работ по отбору, транспортированию и хранению образцов (проб) биоматериала;
- 2 этап — пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов (проб) биоматериала, определение чистоты и концентрации суммарной ДНК;
- 3 этап — проведение ПЦР с парой универсальных праймеров с последующей детекцией ампликонов в агарозном геле (электрофорез) и фотодокументированием;
- 4 этап — проведение секвенирования включает в себя:
  - извлечение ДНК из агарозного геля,
  - очистку ампликонов из агарозного геля или из раствора ПЦР-продукта,
  - проведение секвенирующей ПЦР (СПЦР),
  - очистку продуктов реакции СПЦР от компонентов реакционной смеси,
  - определение нуклеотидной последовательности путем разделения продуктов СПЦР методом капиллярного электрофореза;
- 5 этап — проведение анализа результатов путем сравнения полученной нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, выделенного из анализируемого образца (пробы), с известными последовательностями из электронных баз данных в целях его идентификации.

4.8 Идентификация секвенированных последовательностей осуществляется в существующей генетической базе данных с использованием компьютерных сервисов как инструментов для сравнения и определения первичных нуклеотидных последовательностей.

5 Отбор образцов

Для организации работ по отбору образцов посадочного материала и древесных растений из насаждений, биоматериала из почв, энтомовредителей для ДНК-анализа необходимо выполнение следующих требований:

- предварительно проводят осмотр объектов обследования — растений, подверженных поражению, на участках лесного массива, в продуцирующих отделениях лесных питомников/на объектах лесного семеноводства либо на репродуктивном материале (семена, сеянцы, саженцы) энтомовредителей.
- составляют описание поврежденных объектов с указанием типа поражения, степени повреждения, указывают в этикетке образца;
- проводят фотодокументирование поврежденных объектов;
- определяют географические координаты местности отбора образцов и привязку к административным субъектам;
- проводят отбор биоматериала с соблюдением правил асептики, исключая смешение образцов различных генетических структур;
- доставляют биоматериалы к месту проведения анализа в максимально короткие сроки, помещая образцы в соответствующие условия для транспортирования с учетом их биологических характеристик.

5.1 Требования к проведению отбора образцов посадочного материала и древесных растений из насаждений, биоматериала из почв, энтомовредителей для выявления фитозаболеваний путем проведения генетического анализа (общий подход)

5.1.1 Методы отбора:

- метод «конверта» заключается в отборе точечных образцов от партии или с площади по схеме конверта. В зависимости от объема партии или площади применяют метод одиночного, двойного или тройного «конверта» согласно схемам, приведенным на рисунке 1 (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.2);

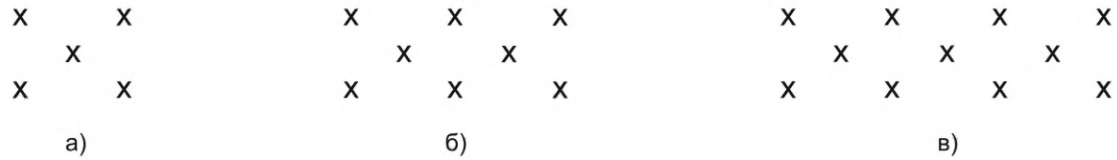


Рисунок 1 — Схемы отбора точечных образцов от партии или с площади методом одиночного, двойного или тройного «конверта»

- метод случайного отбора образцов семян, сеянцев, саженцев, лесных древесных растений заключается в произвольном отборе образцов семян, сеянцев, саженцев, лесных древесных растений от партии или площади (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.2);
- метод отбора образцов с фиксированной пропорцией заключается в отборе определенного количества образцов семян, сеянцев, саженцев, лесных древесных растений в зависимости от объема партии/площади (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.2);
- метод целевого отбора образцов для семян, сеянцев, саженцев, лесных древесных растений заключается в отборе образцов из наиболее вероятно зараженных и/или заселенных частей партии или площади или отборе явно зараженных и/или заселенных образцов семян, сеянцев, саженцев, лесных древесных растений, чтобы увеличить вероятность обнаружения конкретного вредного организма (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.2).

5.1.2 В начале обследования внимательно изучают обследуемый биоматериал (партию семян, лесной посадочный материал, образцы с древесных растений из лесных насаждений, насекомых-вредителей), осматривают участок произрастания сеянцев/саженцев лесных древесных пород, визуально оценивают состояние растений, обращая внимание на характер поражения, глазомерно определяют степень повреждения растений каждой категории состояния. Затем проводят отбор биоматериала с наличием/отсутствием видимых признаков поражения.

Возможное наличие заболеваний растений (сеянцев, саженцев) определяют по следующим признакам:

- угнетенность, отставание в росте;
- увядание, потеря хвои или листьев раньше времени;
- необычное изменение окраски, наличие пятен, некрозов, налетов;
- другие отклонения.

На возможное наличие заболеваний растений указывает также представленность признаков жизнедеятельности энтомовредителей:

- деформирование и/или объедание части ассимиляционного аппарата;
- отверстия в стволе, паутина;
- насекомые и продукты их жизнедеятельности;
- любые другие, нехарактерные для здоровых растений признаки, влияющие на их нормальное физиологическое состояние.

В дополнение для выявления фитозаболеваний проводят осмотр поверхности почвы и лесной подстилки как места аккумуляции микробиоты, в том числе патогенной.

5.2 Отбор образцов семенного материала лесных растений для проведения молекулярно-генетического анализа

Отбор образцов семенного материала лесных растений для проведения молекулярно-генетического анализа проводят с учетом ГОСТ 12430—2019 (подразделы 6.4—6.6, 8.4), [3].

Отбор образцов для ДНК-анализа на биоматериале производят согласно целям обследования, а именно: выявление вида/рода возбудителя заболевания в случае наличия явных признаков заражения партии семян или выявление степени зараженности партии семян в случае наличия/отсутствия видимых признаков заражения.

Отбор образцов семенного материала лесных растений для ДНК-анализа проводят в соответствии с ГОСТ 13056.1—67 (раздел 2), с соблюдением общих принципов отбора и правил безопасности ГОСТ 12430—2019 (подразделы 4.2—4.5, раздел 5).

После первичного осмотра анализируемой партии семенного материала отборщик определяется с методом отбора проб.

5.2.1 Метод случайного отбора для отбора точечных проб, объединенного и среднего образца, применяется в том случае, когда в партии представлены семена без явных признаков поражения бактериозами/микромикозами для определения наличия/отсутствия и выявления вида/рода возбудителя.

При формировании выборки биоматериала для проведения молекулярно-генетического анализа семян, отобранных методом случайного отбора, объем среднего образца должен составлять не менее 200 семян лесных растений.

Количество образцов биоматериала, необходимое для ДНК-анализа, выборка, составляет 30 шт. семян на обследуемую партию (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.4).

5.2.2 Метод отбора с фиксированной пропорцией (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.5) применяют для отбора образцов в случае, когда в партии представлены семена без явных признаков поражения для определения наличия/отсутствия и степени зараженности.

Для определения зараженности масса среднего образца составляет не менее 1 % — 2 % массы всей партии, но не менее 200 шт. семян.

5.2.3 Метод целевого отбора (см. ГОСТ 12430—2019, подраздел 6.6) применяют в том случае, если при первичном осмотре партия семян имеет видимые признаки заражения микробиотой или энтомовредителями для выявления вида/рода возбудителя.

Количество образцов (средний образец), отобранных целевым методом, составляет 200 семян на партию. Из них выделяют выборку 30 шт. семян для ДНК-исследования.

Для проведения ДНК-исследования при всех методах отбора вне зависимости от вида лесных растений семена отбирают в количестве 30 шт.

Остатки семян после проведения анализа хранят в течение одного месяца.

В дополнение для определения зараженности семенного материала при выявлении фитозаболеваний может быть использован культуральный мицелий, выращенный по методикам ГОСТ 13056.5.

Образцы семян маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

Процент зараженности партии определяют отношением суммарной массы/количества семян, определенных как зараженные, к массе/количеству всех семян, взятых для анализа. Полученную величину умножают на 100 % и округляют до целых.

5.3 Отбор образцов из лесных питомников для проведения молекулярно-генетического анализа

Отбор образцов для ДНК-анализа проводят в соответствии с ГОСТ 12430—2019 (разделы 3—5, 10, 13, 20, подраздел 6.6).

Для определения фитопатологического состояния питомника отбор образцов сеянцев/саженцев с разных участков продуцирующих отделений, отличающихся между собой степенью поражения, проводят целевым методом («метод целевого отбора») или методом фиксированной пропорции в количестве не менее 30 шт. пораженных растений. Может быть представлен посадочный материал любой возрастной группы по трем категориям санитарного состояния посадочного материала (визуально здоровые, зараженные, больные). Возраст сеянцев/саженцев указывают в этикетках к образцам.

В случае отсутствия, по визуальной оценке, пораженных растений осуществляют отбор с установленной площади обследования производственного отделения методом «конверта» согласно схемам, приведенным на рисунке 1.

Для молекулярно-генетического анализа используют любые части сеянцев/саженцев: хвоя, листья, а также стебель, древесина, корни.

Для молекулярно-генетического анализа допускается использовать любые части сеянцев/саженцев, соответствующие месту локализации возбудителя заболевания, в зависимости от типа поражения (поражение хвои, побегов, ветвей, ствола или корневой системы). При этом лучшая по качественным и

количественным характеристикам ДНК патогена выделяется из ассимиляционного аппарата растения на границе здоровой и пораженной тканей.

Если высота растений выше 50 см — необходимо отбирать части растений длиной не более 20 см, с характерными признаками поражения по одной ветке с растения.

Количество точек отбора образцов из партии саженцев/сеянцев зависит от площади обследования питомника и принимается в размере пяти точек на гектар обследуемой площади. Количество образцов репродуктивного материала, отбираемого в каждой точке, и общее количество сеянцев/саженцев, отбираемых для проведения ДНК-анализа, приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Нормы отбора точечных образцов методом «конверта» для партии саженцев/сеянцев в зависимости от площади обследования

Площадь обследования, га	Количество точек отбора, шт.	Количество образцов посадочного материала (сеянцы/саженцы) в точке отбора, шт.	Общее количество образцов посадочного материала (сеянцы/саженцы), шт.
0,1—1	5	6	30
1—2	8	4	32
2—3	11	3	33
Более 3*	16	2	32
Более 4	21	2	42
Более 5	26	2	52
*С каждого последующего гектара дополнительно отбираются по пять точечных образцов (точек отбора сеянцев/саженцев) по 6 шт. образцов в точке.			

Отобранные образцы биоматериала, подлежащего ДНК-анализу, упаковывают в бумажные пакеты. Сеянцы/саженцы одной породы, одной возрастной группы, одной категории состояния с одной точки отбора материала, расположенного на обследуемом участке, помещают в один пакет. Не допускается отбор в один пакет образцов с разных питомников, разных пород.

В случае обнаружения при отборе ДНК-образцов вредных насекомых и частей растений с симптомами поражения и/или признаками повреждения или заселения вредными насекомыми их дополнительно отбирают, маркируют и отправляют на анализ.

Образцы маркируют (этикетируют) и направляют для проведения ДНК-исследований.

Остатки образцов после проведения анализа хранят в течение одного месяца.

5.4 Отбор образцов биоматериала (хвоя, листья, стебель, древесина, корни, генеративные органы, плодовые тела грибов) в естественных насаждениях и лесных культурах для проведения молекулярно-генетического анализа

Для характеристики санитарного состояния лесных растений из естественных насаждений и лесных культур с целью определения фитопатогенных организмов, вызывающих заболевания деревьев лесных пород, используют характеристику категорий санитарного состояния деревьев (см. приложение А).

Отбор образцов биоматериала для молекулярно-генетического анализа осуществляют на маршрутных ходах длиной 0,5 км, проложенных в лесных насаждениях. Для размещения маршрутных ходов подбираются участки лесных насаждений, в том числе с наличием очагов болезней леса, из Реестра лесных участков, на которых действуют очаги вредных организмов, отнесенных к карантинным объектам, и Реестра лесных участков, на которых действуют очаги вредных организмов, отнесенных и не отнесенных к карантинным объектам.

Общую площадь насаждений с наличием действующих очагов болезней леса и примыкающих к ним разделяют на участки площадью до 150 га по степени повреждения насаждений болезнями и различной степенью повреждения насаждения. На каждом участке прокладывают маршрутные ходы длиной до 0,5 км (см. [4]).

На протяжении маршрутного хода с интервалом в 100 м выбирают обследуемые/пробные деревья, то есть на одном маршруте — не менее пяти пробных деревьев.

Отбор точечных образцов в естественных насаждениях и лесных культурах проводят методом случайного отбора — при отсутствии видимых повреждений насаждения, в сочетании с методом целевого отбора — при наличии видимых повреждений насаждения в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 — Нормы отбора образцов биоматериала растений для определения микрофлоры, в том числе патогенной (см. [5])

Обследуемый участок	Площадь, га	Маршрутный ход, км	Количество точек отбора образцов (деревьев), шт.	Количество отобранных образцов с точки отбора (дерева), шт.				Количество отобранных образцов с маршрута, (деревьев), шт.	
				Взрослые деревья — древесина/ листья, корень, комель, ствол		Молодняки — хвоя или листья, верх кроны, середина кроны, низ кроны		Взрослые	Молодняки
В очаге с любой степенью заражения (слабая, средняя, сильная)	150	0,5	5	Корень Комель Ствол	1 1 1	Верх Середина Низ	1 1 1	10	10
Вне очага	150	0,5	5	Корень Комель Ствол	1 1 1	Верх Середина Низ	1 1 1	20	20

При поражении патогеном ассимиляционной части растения (хвоя/листва) для определения возбудителя на ранних стадиях заболевания биоматериал для молекулярно-генетического анализа представляет собой образцы хвои/листвы.

Для проведения молекулярно-генетического анализа древесины образцы отбирают путем высверливания в стволе/корнях/толстых ветвях растущего дерева стружки сверлом диаметром 8—10 мм на глубину 1—1,5 см или кернов диаметром 4—5 мм, длиной 5—10 см. Все инструменты, соприкасающиеся с образцом, перед отбором следующего образца дезинфицируют — обрабатывают дезинфицирующим раствором или обжигают огнем не менее 5 с. Не допускается попадание коры в отбираемые образцы. После обработки режущих элементов инструмента зачищают лезвием небольшой участок ствола дерева от коры d = 3—5 см и высверливают керны. Для проведения генетического анализа достаточно 5 г древесных опилок от трех кернов.

Извлеченную из ствола/корней древесину помещают на лист бумаги, а затем пересыпают в бумажный пакет.

В пакет для каждого образца вкладывают этикетку (форма этикетки — см. 5.6.1) и направляют для проведения ДНК-исследований. Схема изготовления пакета приведена в 5.6.2.

Остатки образцов после проведения анализа хранят в течение одного месяца.

5.5 Отбор образцов материала энтомовредителей и продуктов их жизнедеятельности из семян, питомников, лесных культур, естественных насаждений для проведения молекулярно-генетического анализа

5.5.1 Отбор биоматериала энтомовредителей и продуктов их жизнедеятельности из насаждений проводят при осуществлении обследования лесных насаждений для выявления бактериальных/грибных болезней при наличии в них хвое- и листогрызущих насекомых или стволовых вредителей — переносчиков инфекций. Отбор проводят в отдельный контейнер методом целевого отбора из наиболее вероятно зараженных и/или заселенных участков.

При отсутствии видимых проявлений деятельности энтомовредителей используется метод случайного отбора.

Для отбора биоматериала насекомых в насаждениях может быть использован материал из феромонных ловушек.

Феромонные ловушки на обследуемой площади лесного насаждения устанавливают в количестве 3—5 штук на 150 га. С каждой ловушки отбирают по 1—10 образцов насекомых в зависимости от видового состава, каждый вид в отдельный контейнер. Нормы отбора вредных организмов

(насекомых-вредителей) для определения видовой принадлежности и диагностики микрофлоры, в том числе патогенной, приведены в таблице 4.

Каждый контейнер помещают в бумажный пакет с этикеткой. Образец этикетки приведен в таблице 9.

Таблица 4 — Нормы отбора вредных организмов (насекомых-вредителей) для определения видовой принадлежности и диагностики микрофлоры, в том числе патогенной (см. [5])

Обследуемый участок	Площадь, га	Маршрутный ход, км	Количество ловушек, шт.	Количество отобранных с одной ловушки образцов, шт.	Количество отобранных образцов с одного маршрута образцов, шт.
В очаге со слабой, средней, сильной степенью заражения	150	5	3—5	1—10	3—50
Вне очага	150	5	3—5	1—10	3—50

5.5.2 При анализе семенного материала на выявление бактериальных/грибных болезней отбор энтомовредителей — переносчиков инфекций производится в отдельный контейнер методом случайного отбора — при отсутствии видимых проявлений деятельности энтомовредителей, методом целевого отбора — при наличии видимых признаков присутствия энтомовредителей из наиболее вероятно заселенных частей партии в количестве 1—10 штук насекомых от обследуемой партии согласно таблице 5.

Таблица 5 — Нормы отбора вредных организмов (насекомых-вредителей) в семенном материале

Обследуемая партия	Вид заражения	Анализируемая партия семян, кг	Количество семян, отобранных от партии, 100—400 шт.	Количество насекомых от партии, шт.
Зараженная	Внешняя	1—50	200	1—10
	Скрытая	1—50	400	1—10
Не зараженная	Не установлен	1—50	100	1—10

Отбор энтомовредителей — переносчиков инфекций осуществляют в отдельный контейнер, маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

5.5.3 Отбор частей растений со следами деятельности энтомовредителей для определения их таксономической принадлежности или вида/рода заражения насекомого методом ДНК-анализа осуществляется в бумажные пакеты в количестве не менее трех фрагментов с одного растения.

Образцы маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

5.5.4 Образцы почвы из прикорневой зоны или образцы лесной подстилки под пораженным растением отбирают в одноразовые контейнеры или полимерные пакеты в количестве 10—20 г подстилки или 10—20 г почвы с глубины 0—25 см — по одному образцу с места произрастания одного дерева.

Образцы маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

Остатки образцов после проведения анализа хранят в течение одного месяца.

5.6 Маркировка, транспортирование и хранение образцов

5.6.1 Маркировка образцов

В каждый пакет с отобранным генетическим материалом вкладывают этикетку установленного образца (см. таблицы 6—9).

Примечание — Географические координаты указывают в десятичной системе до шестого знака, через точку (например, N 52.370000 E 33.280000). Значение координат указывают одно для всей выборки в любой точке в границах лесного массива, где произведен отбор образцов.

Таблица 6 — Этикетка для образцов сеянцев и саженцев с площади лесного питомника

Выборка № 1, образец № 1	
1 Субъект Российской Федерации	Архангельская область
2 Ближайший населенный пункт	Лешуконское
3 Расстояние до населенного пункта, км	10 км
4 Лесничество	Лешуконское
5 Участковое лесничество	Усть-Вашское
6 Лесной квартал/выдел	100/25
7 Площадь питомника/обследованная площадь	10 га/2,5 га
8 Отделение/поле	Поле 1
9 Древесная порода	Сосна обыкновенная
10 Вид насаждения (сеянцы или саженцы с площади лесного питомника, указать год посадки)	Сеянцы
11 Тип повреждения (изменение цвета хвои/листьев, объедание, деформация, гниль, усыхание, др.)	Усыхание
12 Степень поражения (часть, растение целиком, очаг)	Очаг
13 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
14 Дата взятия образца	20.05.2024
15 Сборщик образца (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

Таблица 7 — Этикетка для образцов хвои, листьев и древесины, репродуктивных органов, шишек, корней, заготовленных в насаждениях

Выборка № 1, образец № 1	
1 Субъект Российской Федерации	Архангельская область
2 Ближайший населенный пункт	Лешуконское
3 Расстояние до населенного пункта, км	10 км
4 Лесничество	Лешуконское
5 Участковое лесничество	Усть-Вашское
6 Лесной квартал/выдел	100/25
7 Древесная порода	Сосна обыкновенная
8 Вид насаждения (естественное, лесные культуры, отдельно стоящие деревья или иное, состав, возраст)	Естественное, 8С2Е, 100 лет
9 Тип повреждения дерева (изменение цвета хвои/листьев, объедание, деформация побегов, гниль, усыхание, др.)	Усыхание
10 Поврежденные части дерева (листья, хвоя, часть сучьев, часть кроны, крона целиком, ствол, растение или дерево целиком)	Часть кроны
11 Степень поражения насаждения	30 %
12 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
13 Дата взятия образца	20.05.2024
14 Сборщик образца (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

Таблица 8 — Этикетка для образцов энтомовредителей, продуктов их жизнедеятельности и поврежденных частей лесных растений

Выборка № 1, образец № 1	
1 Субъект Российской Федерации	Архангельская область
2 Ближайший населенный пункт	Лешуконское
3 Расстояние до населенного пункта, км	10 км
4 Лесничество	Лешуконское
5 Участковое лесничество	Усть-Вашское
6 Лесной квартал/выдел	100/25
7 Древесная порода	Сосна обыкновенная
8 Вид насаждения (естественное, лесные культуры, питомник, отдельно стоящие деревья или иное, состав, возраст)	Естественное, 8С2Е, 100 лет
9 Материал образца (энтомовредитель, метаболит, растение-хозяин, др.)	Поврежденная часть растения
10 Поврежденные части дерева (листья, хвоя, часть сучьев, часть кроны, крона целиком, ствол, растение или дерево целиком)	Часть кроны
11 Степень поражения насаждения	40 %
12 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
13 Дата взятия образца	20.05.2024
14 Сборщик образца (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

Таблица 9 — Этикетка для образцов почвы с площади лесного питомника/насаждения

Выборка № 1, образец № 1	
1 Субъект Российской Федерации	Архангельская область
2 Ближайший населенный пункт	Лешуконское
3 Расстояние до населенного пункта, км	10 км
4 Лесничество	Лешуконское
5 Участковое лесничество	Усть-Вашское
6 Лесной квартал/выдел	100/25
7 Древесная порода	Сосна обыкновенная
8 Вид насаждения (естественное, лесные культуры, питомник, отдельно стоящие деревья или иное, состав, возраст)	Питомник, 1 год
9 Материал образца (лесная подстилка, поверхностный слой, почва прикорневой зоны)	Почва прикорневой зоны
10 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
11 Дата взятия образца	20.05.2024
12 Сборщик образца (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

5.6.2 Упаковка

Подготавливают пакет из бумаги следующим образом:

- сворачивают лист формата А4 вдоль, оставляя с одного края кромку 1 см (см. рисунок 2);
- дважды заворачивают кромку;
- заворачивают нижний край пакета на угол так, чтобы кромка была наверху сгиба;

- подворачивают второй угол нижнего края пакета, заправив его край под кромку;
- после помещения в пакет образца таким же образом закрывают верхний край пакета.

Пакеты необходимо делать из чистых листов бумаги А4.

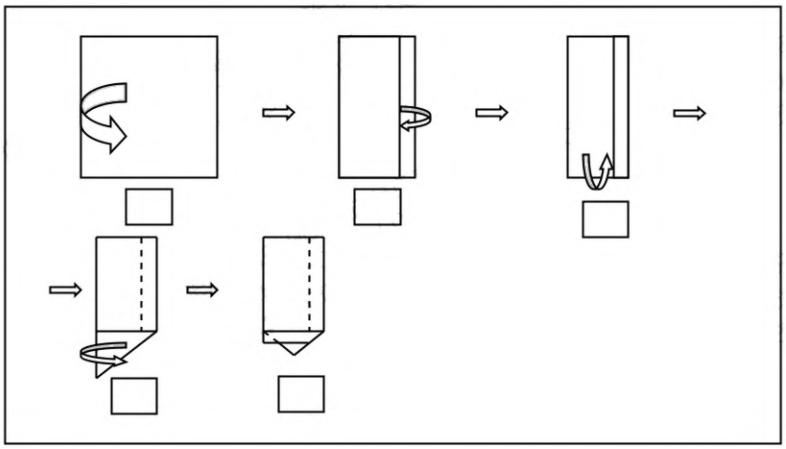


Рисунок 2 — Конверт для отбора образцов биоматериала для ДНК-анализа

5.6.3 Образцы растений и энтомовредителей транспортируют при температуре 0 °С — 5 °С, однако, если условия не позволяют транспортировать образцы в охлажденном виде, допускается их высушивать.

Экссудат собирают в пробирку типа Эппендорф и замораживают при температуре минус 20 °С.

Образцы почв транспортируют в двойных герметичных полимерных пакетах.

5.6.4 Образцы растительного материала и энтомовредителей, помещенные в бумажные пакеты, необходимо высушить в сушильном шкафу при температуре 40 °С в течение 3 сут.

Если высушивание образцов в сушильном шкафу невозможно, образцы высушивают в сухом, хорошо проветриваемом месте, защищенном от прямых солнечных лучей. Образцы следует хранить в бумажных пакетах в сухом месте.

Отобранные и замороженные образцы растительного материала, экссудатов, и энтомовредителей следует хранить в морозильной камере при температуре минус 20 °С — минус 80 °С.

Образцы почв следует хранить не более трех месяцев в бумажных пакетах при комнатной температуре 18 °С — 22 °С.

Образцы отправляют в лабораторию только в сухом или замороженном виде, так как при пересылке нативных (свежих) образцов возможна их порча, в результате чего они будут непригодны для анализа. Также учитывают, что из сухих образцов выделение ДНК патогена/энтомовредителя происходит несколько хуже, чем из свежезамороженных.

5.7 Получение чистой культуры (посев и изоляция на питательную среду)

В ряде случаев микробиологический посев является неотъемлемой частью процесса выявления и идентификации патогенных микроорганизмов, являющихся причиной инфекционных заболеваний древесных растений. Этот метод дает возможность специалистам точнее определять вид возбудителя инфекции, устанавливать заболевание и создает основу для выбора эффективных мер по предупреждению распространения вредных организмов. Данный этап помогает выявить и контролировать распространение инфекций на ранних стадиях.

Получение чистой культуры (с посевом в культуральную среду или во влажную камеру) проводят в соответствии с общепринятыми в микробиологии методиками (см. [3]). Процесс начинается с тщательного отбора биоматериала. Вид необходимого биоматериала может быть разнообразным и зависит от вида возбудителя, характера и проявления заболеваний.

После получения биоматериала проводится его обработка — наращивание массы и/или подготовка для посева на специальные питательные среды (извлечение в суспензию, разведение образца в физиологическом растворе или других специальных буферах для уменьшения концентрации ингибирующих факторов) для повышения чувствительности метода. Далее биоматериал наносят на пита-

тельные среды с использованием специальных инструментов, таких как микробиологические петли или аппликаторы.

Выбор питательной среды зависит от целей исследования и ожидаемых микроорганизмов. Различные виды микробов могут требовать определенных условий для роста, поэтому используются разнообразные среды с различными добавками, например агар, бульон и другие компоненты, способствующие росту и дифференциации микроорганизмов.

После посева биоматериала на питательные среды объект исследования подвергается инкубации при оптимальных температурах и условиях, способствующих росту микроорганизмов.

Приготовление питательных сред для посевов в культуру грибной и бактериальной микрофлоры, раскладку, проращивание микробиоты, анализируемой методами ДНК-анализа, учет зараженности семян отдельно каждым паразитным/сапрофитным грибом/бактерией проводят по общепринятым в микробиологическом анализе методикам (см. ГОСТ Р 54653—2011, раздел 6, а также [4], глава IX).

Все колонии грибов/бактерий, образовавшиеся в растительном биоматериале и вокруг него, отбирают в отдельную пробирку и направляют на ДНК-анализ.

Колонии паразитных грибов учитываются отдельно по каждому роду гриба в процентах от количества разложенных образцов биоматериала (семена, хвоя, стволики, высечки листа). Вычисления производятся до целого числа. По результатам анализов оценивается степень зараженности биоматериала каждым видом гриба, бактерии по частоте встречаемости согласно шкале учета в соответствии с [3].

5.8 Оценка степени зараженности репродуктивного материала по результатам использования методов ДНК-анализа

По результатам ДНК-анализов каждой выборки образцов репродуктивного материала (не менее 30 шт.) оцениваются: частота встречаемости микрофлоры, зараженность материала каждым видом гриба/бактерии по частоте встречаемости.

Частоту встречаемости микрофлоры в образцах посевного/посадочного материала рассчитывают как долю, выраженную в процентах, которую составляет суммарное обилие таксона определенного микроорганизма от суммарного обилия всех таксонов соответствующего сообщества (грибного/бактериального), выявленных на определенных породах и возрастных группах растений за определенный период исследования, и оценивают ее как низкую при показателе менее 25 %, как среднюю — от 25 % до 50 %, высокую — от 50 % и более [6].

Вычисление зараженности каждым видом микрофлоры проводят в процентном отношении от количества образцов обследуемого материала (выборки) до целого числа.

Выделяют следующие степени зараженности репродуктивного материала:

- единичная — менее 5 % от выборки;
- слабая — от 5 % до 25 % от выборки;
- средняя — от 25 % до 50 % от выборки;
- сильная — более 50 % от выборки (см. [3]).

6 Требования к условиям проведения исследований

6.1 Требования к персоналу (квалификации сотрудников)

Выполнение исследований могут производить специалисты с высшим образованием в соответствии с принятым ведомством порядком замещения должностей. Работы проводят после прохождения специалистами испытательного срока.

Допуск персонала к работе должен осуществляться на основании инструктажа и контрольных испытаний в рамках отдельных этапов. Инструктажи по соблюдению требований безопасности должны проводиться не реже одного раза в полгода для проверки знаний персоналом требований безопасности.

6.2 Требования безопасности и к охране окружающей среды

При выполнении исследований следует соблюдать требования безопасности:

- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.4.103;
- электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019;
- организация обучения работающих по технике безопасности (см. [7]);

- помещение для проведения ДНК-анализа должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009;
- все виды отходов (остатки химических веществ) собираются отдельно в специальные контейнеры и по мере накопления передаются специализированным компаниям;
- требования безопасности при работе с вредными веществами в зависимости от их класса — по ГОСТ 12.1.007.

6.3 Требования к стерильности проведения молекулярно-генетических тестов

Молекулярно-генетические тесты проводят в подготовленных для ДНК-анализа стерильных помещениях, оборудованных ламинарными УФ-боксами для защиты объектов исследования от воздействия внешней среды, а также УФ-лампами/рециркуляторами воздуха для поддержания стерильной атмосферы помещения.

Частицы аэрозоля воздуха в помещении, содержащие ДНК-ампликоны, не задерживаются большинством использующихся в оборудовании фильтров (HEPA-фильтрами и т. п.) и могут вызывать постоянное загрязнение ампликонами бокса, а следовательно, и материала, находящегося в нем. Такие фрагменты ДНК или РНК могут быть сформированы искусственно, с использованием различных методов, включая полимеразную цепную реакцию, или лигазную цепную реакцию, или естественным путем — путем дупликации генов.

7 Оборудование, специализированная посуда, расходные материалы и реактивы для молекулярно-генетической диагностики

Молекулярно-генетические тесты проводят в помещениях, оснащенных следующими необходимыми для проведения аналитических работ мебелью, вентиляцией, приборами, оборудованием, дополнительными приспособлениями, посудой и расходными материалами.

7.1 Средства измерения, испытательное, вспомогательное оборудование

При выполнении методики применяют следующие средства измерений и вспомогательное оборудование:

- pH-метр;
- автоклав (стерилизатор) паровой или медицинский УФ-стерилизатор инструментов;
- аквадистиллятор электрический;
- амплификатор (термоциклер);
- бактерицидный УФ-рециркулятор воздуха;
- бокс абактериальной воздушной среды (для выделения ДНК);
- бокс биологической безопасности — ламинарный шкаф (для ПЦР);
- весы лабораторные электронные аналитические (до 0,001 г);
- весы технические (до 1000 г);
- гомогенизатор;
- ИБП к секвенатору;
- источник тока для электрофорезных камер;
- камера морозильная бытовая;
- камеры холодильные (бытовые);
- камера морозильная низкотемпературная (минус 80 °С);
- камеры электрофорезные (горизонтальные);
- компьютер персональный;
- мешалка магнитная без подогрева;
- мешалка магнитная с подогревом;
- микроцентрифуга с охлаждением;
- миницентрифуга-вортекс;
- наборы дозаторов одноканальных или многоканальных разных объемов дозирования (до 1000, до 200, от 0,5 до 10 мкл);
- нанофотометр;
- насос вакуумный с колбой-ловушкой;
- печь микроволновая;

- ротатор-миксер;
- система генетического анализа (секвенатор) с необходимым ПО;
- система гель-документирования;
- система очистки воды 1-го типа;
- термостат твердотельный;
- термошейкер возвратно-поступательный;
- трансиллюминатор;
- шкаф вытяжной;
- шкаф сушильный;
- шкаф термостатирующий.

7.2 Специализированная посуда:

- воронки стеклянные различных размеров (*d* 45—71 мм);
- колбы стеклянные различных объемов (500—1000 мл);
- цилиндры мерные различных объемов (10—500 мл);
- стаканы химические различных объемов (50—500 мл);
- бутыли темные для хранения растворов;
- ступки фарфоровые с пестиками.

7.3 Расходные материалы:

- маркеры различной толщины (0,5, 1,0, 1,5—2,0 мм);
- капилляр(ы) для генетического анализатора;
- наконечники к дозаторам разных объемов (10, 200, 1000 мкл);
- планшеты объемом 0,2 мл;
- пробирки для гомогенизации;
- пробирки для ПЦР (0,2 мл);
- пробирки микроцентрифужные (1,5 и 2,0 мл);
- чашки Петри микробиологические (размер 100 × 20 мм);
- шарики для гомогенизации;
- бумага фильтровальная, фильтры;
- флаконы для образцов.

7.4 Материалы, реактивы и растворы

При выполнении измерений применяют реактивы, материалы (готовые наборы), растворы и стандартные образцы, приведенные в 7.4.1—7.4.4.

7.4.1 Реактивы:

- агароза;
- ацетат аммония;
- борная кислота;
- бромфеноловый синий;
- вода дистиллированная;
- глицерин;
- ДНК-полимераза;
- изоамиловый спирт (изобутилкарбинол);
- натрия хлорид;
- магния хлорид (хлористый магний);
- натрия гидроксид;
- спирт изопропиловый (пропанол-2);
- ТРИС (трометамин);
- уксусная кислота ледяная;
- хлороформ (трихлорметан);
- этидиум бромид (бромистый этидий);
- этиловый спирт (96 %);
- EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота;
- ЦТАБ (CTAB-цетилтриметилламоний бромид).

7.4.2 Материалы:

- анодный/катодный буферы для генетического анализатора;
- набор dNTP;

- набор для очистки ДНК из агарозного геля;
- набор для очистки ДНК после секвенирующей ПЦР;
- набор для проведения калибровки генетического анализатора;
- набор для проведения секвенирующей реакции;
- набор для ПЦР;
- набор фиксаналов для pH-метрии;
- питательные среды для микробиологии (мясопептонный агар — МПА, среда Чапека);
- полимер для генетического анализатора.

Примечание — Приготовление Трис-ацетат-ЭДТА буфера или Трис-борат-ЭДТА буфера, агарозного геля, загрузочного буфера и раствора бромистого этидия описано в приложении А.

7.4.3 Растворы:
- загрузочный буфер (бромфеноловый синий и глицерин);
- раствор бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ-буфера, 3 %);
- раствор ПЦР-смеси;
- раствор Трис-боратного (TBE) буфера (1- и 10-кратный);
- раствор Трис-ацетатного (TAE) буфера (1- и 50-кратный);
- смесь хлороформа и изоамилового спирта.

7.4.4 Стандартные образцы — pGEM — плазмида для положительного контроля при секвенировании.

7.5 Мебель

Помещение для проведения анализов должно быть оснащено мебелью:
- шкаф для хранения посуды;
- шкаф для хранения реактивов;
- шкаф для хранения лабораторной одежды и СИЗ;
- столы лабораторные с термо- и химостойким полимерным покрытием;
- тумбы подкатные с ящиками;
- навесные шкафы;
- мойка глубокая лабораторная;
- стулья вращающиеся.

7.6 Прочее оборудование:
- очки для защиты от УФ-излучения по ГОСТ 12.4.253;
- перчатки латексные или нитрильные;
- петли микробиологические для посева;
- скальпели, ножницы, пинцеты;
- сушилка настенная;
- штативы для дозаторов, пробирок и наконечников.

Примечание — Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования и посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов по качеству не ниже указанных.

8 Порядок проведения ДНК-исследования

8.1 Подготовка к проведению анализа: регистрация, стерилизация

Для проведения молекулярно-генетического анализа работать следует в боксе или ламинарном шкафу. При подготовке к выделению ДНК рабочее место (бокс или ламинарный шкаф) и необходимые приспособления — пробирки, дозаторы, палочки, наконечники и другую посуду также стерилизуют ультрафиолетовым светом длиной волны 220—260 нм в течение 10 мин.

Материал для анализа отбирают из пораженной части растения или на переходе от здоровой к пораженной части или из зоны предполагаемого заражения.

Образцы биоматериала лесных древесных растений (семена, хвоя, листья, древесина — в виде кернов, опилок), вредителей, почвы, поступающие для анализа, регистрируют в журнале учета с соблюдением установленных критериев учета, в соответствии со спецификой требований к обследованиям биоматериала.

8.2 Подготовка аналитических проб растительного материала

Образцы хвои следует мелко измельчить. При работе с опилками отбирают самые мелкие из них, без включений коры. Масса образца должна быть приблизительно 40 мг. Образцы помещают в пробирки типа «Eppendorf» 1,5 мл с нанесением индекса образцов.

8.3 Выделение ДНК

8.3.1 Методические указания к протоколу выделения ДНК

Навеску растительной ткани массой 20—50 мг помещают в стерильную ступку для растирания, добавляют 1,0 (1,2) мл прогретого до температуры 65 °С 3 %-ного ЦТАБ-буфера (ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис, вода дистиллированная) и максимально гомогенизируют образец. Древесные образцы предпочтительнее растирать при помощи гомогенизатора. Приготовление всех необходимых растворов описано в приложении Б.

Перемещают гомогенат в заранее промаркированные и прогретые в термостате до 65 °С центрифужные пробирки типа «Eppendorf» на 2 мл. Инкубируют в термостате 2—3 мин, в случае с древесиной — 10 мин при 65 °С.

После инкубации образцы следует встряхнуть на вортексе и охладить пробирки с гомогенатом до комнатной температуры. Приготавливают заранее и вносят в каждую пробу равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта для осаждения белков (24:1 соответственно) (работа под вытяжкой).

Тщательно перемешивают пробы круговыми движениями в течение 2 мин вручную или при помощи ротатора-миксера (ротационного перемешивателя), затем центрифугируют пробы 3 мин при комнатной температуре со скоростью 13 000 об/мин.

Заранее готовят и маркируют микроцентрифужные пробирки типа «Eppendorf» на 1,5 мл и после центрифугирования образцов переносят в них весь супернатант 250—700 мкл, не задевая среднюю и нижнюю фазы, которые в дальнейшей работе не используют. Пробирку с остатками растертого материала и использованные наконечники для дозаторов необходимо утилизировать.

Вносят в каждую пробу охлажденный в морозилке изопропиловый спирт в количестве 0,7 части от объема отобранного супернатанта. Тщательно перемешивают пробы в течение 2 мин вручную или при помощи ротационного перемешивателя.

Центрифугируют пробы при комнатной температуре 5 мин на максимальных оборотах.

Аккуратно удаляют надосадочную жидкость с помощью колбы-ловушки или вручную (образовавшийся осадок, состоящий из ДНК и полисахаридов, должен остаться в пробирке). Затем оставляют пробы на несколько минут для испарения оставшейся жидкости под вытяжкой.

Осадок промывают от остатков буфера, изопропанола и хлороформа со встряхиванием каждый раз на вортексе. Для этого необходимо добавить в пробирки с пробами по 1 мл 96 %-ного этилового спирта и тщательно перемешать на вортексе в течение 2 мин, затем центрифугировать в течение 3 мин при максимальных оборотах (при комнатной температуре).

Удаляют жидкость из проб вручную или при помощи колбы-ловушки (необходимо следить за осадком) и повторяют процедуру промывки этанолом. Затем полностью высушивают осадок, не закрывая пробирки, в термостате при температуре 55 °С.

Для растворения выделенной ДНК добавляют в пробы необходимое количество mQ-воды в зависимости от размера полученного осадка (для образцов хвои — 30—40 мкл, для древесины — 10—20 мкл). Перемещают пробы на термошейкер и при температуре 40 °С и максимальных оборотах перемешивают их до полного растворения осадка.

Полученный раствор ДНК следует использовать для дальнейшей работы, для чего поместить на хранение при температуре 2 °С — 8 °С на срок до двух месяцев. Для последующих работ образцы необходимо хранить при температуре минус 20 °С и исключить их частое размораживание. Длительное хранение (до одного года) образцов необходимо обеспечить в низкотемпературных морозильных камерах при температуре минус 80 °С.

8.3.2 Качественный и количественный анализ ДНК. Спектрофотометрическое измерение концентрации

Поскольку концентрация и чистота образца ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа, необходимо установление значений этих показателей с помощью спектрофотометра. Для определения количества ДНК измеряют поглощение раствора в областях с длинами волн 230, 260 и 280 нм. Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе и выровнять до необходимой концентрации все образцы выборки перед проведением ПЦР.

Оптическая плотность D = 1А соответствует приблизительно 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК. Соотношение экстинкции 260/280 нм позволяет судить о наличии загрязнителей нуклеиновой кислоты. Коэффициент отношения волн 230/260 нм должен быть в пределах 0,3—0,9. Выход за параметры этих значений будет свидетельствовать о чрезмерном загрязнении образцов примесями (белки, фенолы, соли и др.) или неэффективном выделении — требования методик [8] — [10]. Концентрацию проб образцов до оптимального (необходимого) значения следует довести путем разбавления mQ-водой.

Определение концентрации ДНК и чистоты препарата выделенного образца проводят с помощью спектрофотометра.

8.4 Видовая идентификация

8.4.1 Проведение ПЦР с универсальными праймерами с последующим секвенированием

Для проведения ПЦР используется амплификатор (или термоциклер).

Для диагностики фитопатогенов допускается использовать два типа праймеров: универсальные и видоспецифические. Универсальные праймеры используют для определения фитопатогенных грибов, бактерий и насекомых.

В качестве универсальных праймеров в мире используют локусы рибосомальной ДНК грибов (рДНК), бактерий и насекомых, приведенные в таблицах 10—12 соответственно.

Таблица 10 — Универсальные праймеры для определения рибосомальной ДНК грибов-патогенов

Наименование локуса	Праймер/последовательность нуклеотидов
ITS (рДНК)	ITS1 tcc-gta-ggt-gaa-cct-gcg-g
	ITS2 gct-gcg-ttc-ttc-atc-gat-gc
	ITS3 gca-tcg-atg-aag-aac-gca-gc
	ITS4 tcc-tcc-gct-tat-tga-tat-gc
B-тубулин	F: gtb-cac-cty-car-acc-ggy-car-tg
	R: ccr-gay-tgr-ccr-aar-acr-aag-ttg-tc

Таблица 11 — Универсальные праймеры для определения ДНК бактерий-патогенов

Наименование локуса	Праймер/последовательность нуклеотидов
Bact_8-27_F/Bac_906-26_R	F: ccg-tca-att-cct-ttr-agt-tt
	R: aga-gtt-tga-tcc-tgg-ctc-ag
8F/1492R	F: aga-gtt-tga-tcc-tgg-ctc-ag
	R: ggt-tac-ctt-gtt-acg-act-t

Таблица 12 — Праймеры для определения фрагмента митохондриального гена COI, отвечающего за синтез фермента цитохром-С-оксидазы у насекомых

Наименование локуса	Праймер/последовательность нуклеотидов
LCO1490/ HC02198	F: ggt-caa-caa-atc-ata-aag-ata-ttg-g
	R: taa-act-tca-ggg-tga-cca-aaa-aat-ca

8.4.2 Постановка ПЦР (протокол, методические указания)

Для проведения реакции амплификации применяют как отдельные компоненты для приготовления реакционной смеси, так и готовые наборы. При проведении ПЦР необходимо использовать положительный (+) и отрицательный (–) контроль. В качестве положительного (+) контроля следует использовать ДНК патогена грибной, бактериальной микрофлоры или ДНК насекомого (в зависимости от используемого праймера). В качестве отрицательного (–) контроля следует использовать бидистиллированную воду или тот растворитель, в котором была растворена исследуемая ДНК [8], [9].

8.4.2.1 Алгоритм действий при использовании отдельных компонентов

Перед приготовлением реакционной смеси для проведения ПЦР разморозить все необходимые реагенты, праймеры, ДНК, выделенную из исследуемых образцов, встряхнуть на вортексе и осадить для удаления жидкости с крышек пробирок.

Необходимо определить количество реакций исходя из количества исследуемых проб.

Затем следует смешать все компоненты в одной пробирке в соответствии с прописью (см. таблицу 13).

Таблица 13 — Состав реакционной смеси с использованием отдельных компонентов

Наименование компонента	Объем на одну реакцию
10 × ПЦР буфер (100мМ Трис HCl, pH 9,2, 250 мМ KCl)	2,5 мкл
25мМ $MgCl_2$	2,5 мкл
смесь 5 мМ нуклеотидтрифосфатов	1 мкл
10 мМ раствор каждого праймера	1 мкл
Taq ДНК-полимераза (1 ед./мкл)	1 мкл
Деионизированная вода	16 мкл
Примечание — В настоящей таблице приведен состав стандартной ПЦР-смеси. В зависимости от концентрации образца, фирмы-поставщика реактивов, концентрации праймера и других причин возможны изменения параметров. По каждому тестируемому агенту (эксперименту) может потребоваться корректировка ПЦР-смеси.	

Распределяют ПЦР-смесь в равных долях по пробиркам в зависимости от количества исследуемых проб.

В соответствующие пробирки, содержащие перемешанные компоненты реакции, вносят по 1 мкл пробы ДНК исследуемых объектов с концентрацией 100 нг/мкл.

Перемешивают, осаждают и помещают в амплификатор, запустив соответствующий протокол.

После завершения программы амплификации ПЦР-продукт используется для дальнейшего анализа.

8.4.2.2 Алгоритм действий при использовании ПЦР-набора

При использовании готовых наборов необходимо следовать инструкциям производителя. Пример проведения операций:

а) перед приготовлением реакционной смеси подготовливают ДНК, встряхивают на вортексе и осаждают для удаления жидкости с крышек пробирок;

б) определяют количество реакций исходя из количества исследуемых проб;

в) смешивают все компоненты в одной пробирке в соответствии с прописью (см. таблицу 14);

Таблица 14 — Состав реакционной смеси с использованием ПЦР-набора

Наименование компонента	Объем на 1 реакцию
Буфер	10 мкл
Микс праймеров	5 мкл
Примечание — Перед постановкой ПЦР заранее приготовить микс праймеров: 10 мкл F (100 мМ) + 10 мкл R (100 мМ) + 380 мкл mQ.	

г) добавляют во все пробирки с лиофилизированными компонентами по 15 мкл ПЦР-смеси;

д) добавляют в соответствующие пробирки по 5 мкл исследуемой ДНК и тщательно перемешивают. Суммарный объем добавляемых компонентов — 20 мкл. Закрывают крышки и осаждают капли кратковременным центрифугированием;

е) переносят пробирки в амплификатор и запускают необходимый режим амплификации (см. таблицу 15);

ж) после завершения программы амплификации 5—10 мкл ПЦР-продукта используют для электрофореза без дополнительного разбавления буфером для нанесения.

Таблица 15 — Стандартный режим амплификации

Наименование стадии амплификации	Количество циклов, шт.	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	15 мин
Денатурация	37	95	15 с
Отжиг		55—65	20 с
Элонгация		72	40 с
Заключительная элонгация	1	72	4 мин
Охлаждение	1	4	∞

Примечание — Это стандартный режим амплификации для праймеров с длиной цепи примерно 20 пар нуклеотидов. Для каждой пары праймеров необходимо вносить изменения температуры отжига. В идеале температура отжига должна быть на 2 °С — 3 °С ниже температуры плавления праймера. В зависимости от поставленной задачи возможны варианты режима амплификации.

8.4.3 Проведение полимеразной цепной реакции с видоспецифическими праймерами

Для проведения полимеразной цепной реакции также используется амплификатор (или термоциклер) модели Т100 или др.

Для диагностики фитопатогенов в качестве видоспецифических праймеров используют локусы рибосомальной ДНК грибов (рДНК), приведенные в таблице 16.

Таблица 16 — Видоспецифические праймеры

Определяемый патоген		Наименование локуса и последовательность нуклеотидов в праймерах	
Рак ступенчатый лиственных пород	*(Nectria galligena)*	Ch1 aac-ccc-tgt-gaa-cat-acc-cat-c 3′	Прямой
		Cp2 4315′ gtg-gcc-gcg-ctg-ctc-ttc-cg 3′	Обратный
Смоляной рак сосны (серянка)	*(Cronartium ribicola)*	CrRF atg-gag-taa-tac-ctg-gcg-gtg-a	Прямой
		ITS4 tcc-tcc-gct-tat-tga-tat-gc	Обратный
Корневая губка	*(Heterobasidian sp.)*	Hesp F ttc-ata-tcc-atc-tca-cac-ctg-tg	Прямой
		ITS2 gct-gcg-ttc-ttc-atc-gat-gc	Обратный
Опенок осенний	*(Armillaria spp.)*	Armi2R aaa-ccc-cca-taa-tcc-aat-cc	Прямой
		ITS2	Обратный
Трутовик плоский	*(Ganoderma spp.)*	Gano2R tat-aga-gtt-tgt-gat-aaa-cgc-a	Прямой
		ITS1 tcc-gta-ggt-gaa-cct-gcg-g	Обратный
Губка дубовая	*(Daedalea quercina)*	DaQF cag-tgt-ctg-gct-cct-ctt-gaa-tg	Прямой
		ITS4	Обратный
Трутовик серно-желтый	*(Laetiporus sulfurens)*	Laet R ccg-agc-aaa-cga-atg-caa	Прямой
		25sF tgg-cga-gag-acc-gat-agc	Обратный
Трутовик чешуйчатый	*(Poliporus squamosus)*	PoS F tgt-att-gtg-atg-taa-cgc-atc-g	Прямой
		ITS4 обратный	Обратный

Окончание таблицы 16

Определяемый патоген		Наименование локуса и последовательность нуклеотидов в праймерах	
Трутовик настоящий	*(Fomes fomentarius)*	FoF F tta-caa-act-att-gaa-gta-aca-g	Прямой
		ITS2	Обратный
Конгломерат родов трутовиков	*Inonotus-Phellinus*	Hyme2R tgc-dcc-ccc-tyg-cgg-ag	Прямой
Трутовик осиновый	*(Ph. tremulae)*		
Трутовик ложный	*(Ph. iguiartius)*		
Трутовик дубовый	*(Ph. robustus)*		
Трутовик Гартига	*(Ph. Hartigii)*	F115 taa-gcg-acc-cgt-ctt-gaa-ac	Обратный
Губка сосновая	*(Ph. pini)*		
Губка еловая	*(Ph. pini var. Abienis)*		
Трутовик скошенный Чага	*(I. obliquus)*		
Трутовик дуболюбивый	*(I. dryophilus)*		
Шютте настоящее	*(Lophodermium seditiosum)*	Ls 11 cac-cct-ttg-ttt-acc-aca-ctc-a	Прямой
		Ls 12 cgg-cac-ctg-ctg-tcc-ttc	Обратный
Шютте обыкновенное	*(Lophodermium pinastri)*	Lp 3 gcc-agt-gga-cag-aaa-ccc-t	Прямой
		Lp 6 gcc-tag-gcc-tct-cct-tcc	Обратный
Другие хозяйственно-опасные патогены лесных древесных растений, приведенные в базах данных.			

Нуклеотидные структуры видоспецифических праймеров и размеры ампликонов фитопатогенов приведены в таблице 17.

Таблица 17 — Нуклеотидные структуры видоспецифических праймеров и размеры ампликонов фитопатогенов

Наименование заболевания	Вид патогена	Комбинация праймеров (F и R), размер ампликона, п.н.	
		Вариант 1	Вариант 2
Альтернариоз	Alternaria alternata	gtg-ttg-ggc-gtc-ttg-tct-ct cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 160	cct-caa-gct-ttg-ctt-ggt-gt cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 176
Серая гниль	Botrytis cinerea	ggt-aga-cct-ccc-acc-ctt-gt ttg-aaa-tga-cgc-tcg-aac-ag 288	aca-gag-ttc-atg-ccc-gaa-ag ttg-aaa-tga-cgc-tcg-aac-ag 308
Кладоспориоз	Cladosporium cladosporides	ttg-ttg-tcc-gac-tct-gtt-gc cct-acc tga-tcc gag gtc-aa 443	ttg-ttg-tcc-gac-tct-gtt-gc caa-cgc-tta-ggg-gac-aga-ag 361
Эпикоккоз	Epiccocum nigrum	tgg-act-tcg-gtc-tgc-tac-ct ttt-gga-cgt-cgt-cgt-tat-ga 429	gtt-gca-atc-agc-gtc-tga-aa atg-tac-tgc-gct-ccg-aaa-tc 298
Фузариоз	Fusarium oxysporum	ctg-ttc-gag-cgt-cat-ttc-aa cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 204	ctg-ttc-gag-cgt-cat-ttc-aa cag-cgg-gta-ttc-cta-cct-ga 215
Шютте	Lophodermium pinastri	ttc-acg-gcc-gct-ata-ttc-tc cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 437	atc-tct-tgg-ttc-tgg-cat-cg cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 308
Мучнистая роса (дуба)	Microsphaera alphitoides	gat-ctc-ttg-gct-ctg-gca-tc gac-tgg-agc-aag-tgg-gtt-gt 307	cag-agt-gtg-agg-ctc-agt-cg tgt-tat-gac-gct-cga-aca-gg 380
Фомоз	Phoma herbarum	gtt-gca-atc-agc-gtc-tga-aa ttt-gga-cgt-cgt-cgt-tat-ga 330	cct-aga-gtt-gtg-ggc-ttt-gc cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 471

Окончание таблицы 17

Наименование заболевания	Вид патогена	Комбинация праймеров (F и R), размер ампликона, п.н.	
		Вариант 1	Вариант 2
Ризоктония	Rhizoctonia solani	tta-tcc-atc-aca-ccc-cct-gt ttt-tta-ccg-ggt-gtc-ctc-ag 469	caa-cgg-atc-tct-tgg-ctc-tc ttt-tta-ccg-ggt-gtc-ctc-ag 320
Побурение хвои	Rhizosphaera kalkhoffii	cct-gtt-cga-gcg-tca-tta-ca cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 202	ttc-gag-cgt-cat-tac-acc-ac cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 198
Склерофомоз сосны	Sydowia polyspora	gtt-cga-gcg-tca-tta-cac-ca cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 198	ttc-gag-cgt-cat-tac-acc-ac cct-acc-tga-tcc-gag-gtc-aa 197
Другие хозяйственно-опасные патогены лесных древесных растений, приведенные в базах данных.			

8.4.4 Визуализация результатов ПЦР

Визуализация результатов ПЦР (первичная) производится с помощью проведения горизонтального электрофореза в 1,5 % — 2 % агарозном геле с Трис-ацетат-ЭДТА буфером или с Трис-борат-ЭДТА буфером.

8.4.4.1 Проведение электрофореза в агарозном геле

Агарозный гель используют при анализе крупных фрагментов ДНК. Электрофоретическое разделение проводят в камерах для горизонтального электрофореза. Для определения длин фрагментов исследуемой ДНК в качестве эталона используется маркер длин — ДНК 100 bp + 50 bp. Сбор камер, подготовку гелей, нанесение образцов в агарозный гель, электрофоретическое разделение, снятие и окрашивание гелей проводить в соответствии с общепринятыми в биотехнологии методиками (см. [8] — [10]).

Состав 1,5 % — 2 % агарозного геля на один заливочный столик:

- агароза — от 1,5 до 2 г,
- Трис-ацетат-ЭДТА буфер или Трис-борат-ЭДТА буфер 50-кратный — 2 мл,
- дистиллированная вода — довести до 100 мл.

Расплавленный 1,5 % — 2,0 % и немного остывший агарозный гель заливают в заливочный столик, помещают гребенки и оставляют при комнатной температуре до полного застывания. Погружают заливочный столик с застывшим гелем в камеру для горизонтального электрофореза, заливают камеру 1-кратным TBE или TAE-буфером, удаляют гребенки и вносят в образовавшиеся карманы смесь ПЦР-продукта и загрузочного буфера (на 25 мкл ПЦР-продукта — 5 мкл загрузочного буфера). Если ПЦР проводилась при помощи коммерческих готовых наборов, загрузочный буфер не добавляют. Затем необходимо закрыть камеру и подключить ее к источнику питания на мощность 10 Вт. Электрофорез следует проводить 1,5—2,5 ч. После окончания электрофореза гель поместить в раствор бромистого этидия для окрашивания на 5—10 мин. После окраски гель тщательно промывают проточной водой от остатков красителя.

Примечание — Приготовление Трис-ацетат-ЭДТА буфера или Трис-борат-ЭДТА буфера, агарозного геля, загрузочного буфера и раствора бромистого этидия описано в приложении Б.

8.4.4.2 Визуализация результатов электрофореза

Визуализацию и документирование продуктов электрофоретического разделения следует производить в УФ-свете, с соблюдением правил технической безопасности, с помощью трансиллюминатора и системы гель-документирования с цифровой фотокамерой, встроенным компьютером с соответствующим программным обеспечением.

ДНК будет видна в виде светящихся полос на черном фоне.

После сохранения снимка (электрофореграммы):

- при проведении ПЦР с видоспецифическими праймерами лабораторные исследования на данном этапе заканчиваются;
- при проведении ПЦР с универсальными праймерами допускается приступать к извлечению и очистке ампликонов от агарозного геля.

8.5 Секвенирование биологического материала на генетическом анализаторе

Для проведения секвенирования используется метод терминации цепи, или метод Сэнгера, основанный на применении дидезоксинуклеотидтрифосфатов (см. [8]). Данный метод включает два этапа: первый — секвенирующая реакция с применением меченых красителей дидезоксинуклеотидтрифосфатов и второй — электрофоретическое фракционирование полученных меченых фрагментов различной длины, с последующей лазерной детекцией.

Для электрофоретического анализа и детекции меченых продуктов следует использовать генетический анализатор в соответствии с прилагаемой инструкцией.

8.5.1 Методические указания секвенирования ампликонов. Постановка секвенирующей ПЦР — СПЦР (протокол)

Секвенирующую реакцию следует проводить в специальных полипропиленовых тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл. Для постановки секвенирующей ПЦР — СПЦР применяют набор для циклического секвенирования.

Перед приготовлением реакционной смеси размораживают на льду компоненты набора для циклического секвенирования, праймер прямой или обратный, ДНК, очищенную из агарозного геля. Все перемешивают на вортексе и осаждают для удаления жидкости с крышек пробирок.

Определяют количество реакций исходя из количества всех проб, подписывают пробирки и готовят реакционную смесь следующего состава (см. таблицу 18).

Таблица 18 — Состав реакционной смеси для СПЦР

Наименование компонента	Объем на одну реакцию
Деионизированная вода	5 мкл
Буфер для секвенирования	1 мкл
Смесь для СПЦР	2 мкл
Праймер прямой или обратный (3,2 мМ)	1 мкл (3,2 мМ)
Образец ампликона	мкл (5—20 нг)

В соответствующие пробирки, содержащие перемешанные компоненты реакции вносят по 1 мкл образца.

Помещают пробирки в амплификатор и проводят амплификацию.

Примечание — Всю работу проводят на холоде с использованием изотермического штатива.

Секвенирующую реакцию проводят по программе амплифицирования, представленной в таблице 19.

Таблица 19 — Режим амплификации для проведения секвенирующей реакции

Наименование стадии амплификации	Количество циклов, шт.	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	96	1 мин
Денатурация	35	96	10 с
Отжиг		50	5 с
Элонгация		60	4 мин
Заключительная элонгация	1	60	7 мин
Охлаждение	1	4	∞

После секвенирующей ПЦР необходимо провести очистку продукта от непрореагировавших компонентов.

8.5.2 Очистка продуктов после проведения секвенирующей ПЦР (СПЦР) с целью дальнейшего секвенирования

Целью очистки продуктов реакции секвенирования является максимально полное удаление заряженных низкомолекулярных примесей, прежде всего остатков флуоресцентно-меченных терминаторов, дНТФ и неорганических анионов.

Наиболее часто используемыми являются следующие варианты очистки:

- очистка с помощью избирательной сорбции низкомолекулярных анионов и катионов, включая флуоресцентно-меченные ддНТФ, дНТФ и неорганические соли;
- высаживание в системе этиловый спирт/ацетат аммония;
- очистка на колонках или плашках для гель-фильтрации;
- очистка на магнитных частицах.

Очистку проводят с помощью набора для очистки продуктов реакции секвенирования ДНК или с помощью смеси с ацетатом аммония.

8.5.3 Очистка ацетатом аммония

На 10 мкл СПЦР-смеси необходимо добавить по 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом (см. таблицу 20), затем перемешивают на вортексе или ротаторе. Данную процедуру необходимо проводить при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего центрифугировать при 14 000 об/мин в течение 20 мин. Удаляют супернатант и промывают осадок в 250—500 мкл 70 %-ного этанола комнатной температуры. Затем образцы следует высушить в термостате и растворить их в деионизированной воде.

Таблица 20 — Состав смеси ацетата аммония с этанолом

Наименование компонента	Объем на 1 пробу (10 мкл)
Деионизированная вода	4,7 мкл
Ацетат аммония	1,5 мкл
Этанол 96 %	43,8 мкл
Итого	50 мкл

8.5.4 Секвенирование. Определение структуры ДНК с использованием генетического анализатора

Для получения расшифрованной последовательности ДНК проводят сиквенсовый анализ — электрофоретическое разделение продуктов реакции секвенирования.

Секвенирование (от слова sequence — последовательность) — определение порядка элементарных единиц мономеров в полимере. Данным полимером может быть не только ДНК или РНК, но и, например, белок или полисахарид.

Исследования структуры ДНК с использованием генетического анализатора проводят путем капиллярного электрофореза в денатурирующих гелях (см. [11]).

Воспроизводимое фракционирование однонитевых молекул ДНК и РНК, а также определение их молекулярной массы по скорости миграции в геле оказываются возможными только при сохранении условий денатурации в ходе самого электрофореза. Поэтому во всех случаях, когда нет необходимости сохранить нативную структуру, нуклеиновые кислоты предпочитают фракционировать электрофорезом в денатурирующих условиях, или, как говорят, в денатурирующих гелях. Это означает, что внутри геля создается среда, препятствующая комплементарному спариванию одинарных нитей нуклеиновых кислот или их участков (см. [11]).

В некоторых случаях эта среда способствует распрямлению нитей, что делает зависимость скоростей миграции от значений длины полинуклеотидов более строгой, обеспечивает возможность их тонкого фракционирования и оценки молекулярной массы (сопоставлением с маркерами).

Капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе проводят в соответствии с руководством пользователя, предоставляемым производителем. При этом должна быть выполнена последовательность стандартных процедур:

- запуск прибора:
- включить прибор;
- включить ПК;

- запустить ПО;
- установить температуру камеры детекции 50 °С — 60 °С;
- установить пробы:
- собрать сэндвич-панель: планшеты или стрипы с образцами закрыть сверху мягкой септой для запечатывания проб и поместить в плашку;
- сформированную конструкцию (сэндвич-панель) установить в автоматический блок позиционирования (автосэмплер);
- отправить автосэмплер на стартовое положение и закрыть дверку прибора.
- запуск секвенирования:
- в ПО — ввести наименование плашки, заполнить наименованиями образцов поле виртуальной плашки (назвать образцы, согласно занимаемому месту в штативе);
- выбрать созданный лист анализируемых образцов (в дальнейшем будет пониматься, как матрикс);
- в ПО — выбрать режим анализа (задать условия электрофореза — протокол, соответствующий необходимым параметрам (тип анализа, длина капилляра, тип полимера, тип используемого набора), добавить данные плашки;
- в окне добавить из библиотеки — добавить плашку;
- в окне результаты групп — внести наименование плашки, сохранить в библиотеку;
- произвести запуск электрофореза.
- завершение работы:
- открыть дверцы прибора;
- изъять образцы, выдвинув автосэмплер;
- разобрать и промыть сэндвич-панель;
- закрыть и выключить прибор.

Порядок проведения капиллярного электрофореза на одноканальном и восьмиканальном генетических анализаторах приведен в приложении В.

8.6 Получение, оформление и интерпретация результатов исследований (сравнительный анализ в базах данных)

8.6.1 Использование программ для интерпретации результатов исследований

Данные секвенирования локусов ДНК для определения по виду последовательности принадлежности ДНК микрофлоры тому или иному роду/виду патогена и насекомого заносят в информационную референсную базу генетических данных.

Обработку и интерпретацию полученных результатов проводят на основании использования ПО, прилагаемого к используемому для анализа секвенатору.

Результатом обработки является полученная в ходе электрофореза нуклеотидная последовательность.

8.6.2 Установление видовой принадлежности

Проведение видовой идентификации — поиска систематического названия патогена в соответствии с биологической классификацией основано на осуществлении поиска соответствия между нуклеотидной последовательностью образца и гомологичными последовательностями в имеющихся базах данных микроорганизмов.

Видовая принадлежность определяется по максимально близкому совпадению полученных последовательностей с депонированными последовательностями с учетом степени сходства.

Порядок проведения видовой идентификации приведен в приложении Г.

Результаты исследований оформляются заключением и записью в журнале. Заключение и запись в журнале удостоверяет лицо, проводившее исследование.

Приложение А
(рекомендуемое)

Шкала категорий санитарного состояния деревьев (см. [12])

Таблица А.1

Категория санитарного состояния деревьев	Диагностические признаки по категориям санитарного состояния деревьев	
	Хвойные	Лиственные
1 — здоровые (без признаков ослабления)	Деревья нормального развития, крона густая, нормальной формы (для этой породы, возраста, условий местопроизрастания и сезонного периода), окраска и величина хвои (листвы) нормальные, прирост текущего года нормального размера, повреждения вредителями и поражение болезнями отсутствуют, без механических повреждений ствола, скелетных ветвей, ран и дупел	
2 — ослабленные	Деревья с начальными признаками ослабления, крона разреженная, хвоя светло-зеленая, прирост уменьшен, но не более чем наполовину, отдельные ветви засохли, в кроне менее 25 % сухих ветвей, возможны признаки местного повреждения ствола и корневых лап, ветвей, допустимо наличие механических повреждений и небольших дупел, не угрожающих их жизни	Деревья с начальными признаками ослабления, недостаточно облиственные крона разреженная, листва светло-зеленая, прирост уменьшен, но не более чем наполовину, отдельные ветви засохли, в кроне менее 25 % сухих ветвей, единичные водяные побеги, возможны признаки местного повреждения ствола и корневых лап, ветвей, допустимо наличие механических повреждений и небольших дупел, не угрожающих их жизни
3 — сильно ослабленные	Деревья в активной стадии повреждения неблагоприятными факторами с явно выраженными признаками ухудшения состояния, крона ажурная, слабо развита, хвоя светло-зеленая, матовая, прирост слабый, менее половины обычного, наличие усыхающих или усохших ветвей, усыхание ветвей до $^2/_3$ кроны, сухих ветвей от 25 % до 50 %, плодовые тела трутовых грибов или характерные для них дупла, возможны значительные механические повреждения ствола, суховершинность, часто имеются признаки повреждения болезнями и вредителями ствола, корневых лап, ветвей, хвои, в том числе, попытки или местные поселения стволовых вредителей	Деревья в активной стадии повреждения неблагоприятными факторами с явно выраженными признаками ухудшения состояния, крона ажурная слабо развита, листва мелкая, светло-зеленая, светлее или желтее обычной, прирост слабый, менее половины обычного, наличие усыхающих или усохших ветвей, усыхание ветвей до $^2/_3$ кроны, сухих ветвей от 25 % до 50 %, обильные водяные побеги на стволе и ветвях, плодовые тела трутовых грибов или характерные для них дупла, возможны значительные механические повреждения ствола, суховершинность, часто имеются признаки повреждения болезнями и вредителями ствола, корневых лап, ветвей, листвы, в том числе, попытки или местные поселения стволовых вредителей
4 — усыхающие	Деревья, поврежденные в сильной степени с максимальной вероятностью их усыхания в текущем вегетационном периоде, крона сильно ажурная, изреженная, хвоя серая, желтоватая или желто-зеленая, прирост очень слабый или отсутствует, хвоя на побеге текущего года не развитая, усыхание более $^2/_3$ ветвей, сухих ветвей более 50 процентов, на стволе и ветвях выражены явные признаки заселения стволовыми вредителями (входные отверстия, насечки, смолотечение, смоляные воронки, буровая мука и опилки, насекомые на коре, под корой и в древесине)	Деревья, поврежденные в сильной степени с высокой вероятностью их усыхания в текущем или следующем вегетационном периоде, крона сильно ажурная, листва мелкая, редкая, светло-зеленая или желтоватая, прирост очень слабый или отсутствует, усыхание более $^2/_3$ ветвей, сухих ветвей более 50 процентов, на стволе и ветвях возможны признаки заселения стволовыми вредителями (входные отверстия, насечки, сокотечение, буровая мука и опилки, насекомые на коре, под корой и в древесине), обильные водяные побеги, частично усохшие или усыхающие
5 — погибшие	Деревья, полностью утратившие жизнеспособность	

Окончание таблицы А.1

Категория санитарного состояния деревьев	Диагностические признаки по категориям санитарного состояния деревьев	
	Хвойные	Лиственные
5(а) — свежий сухостой	Деревья, усохшие в течение текущего вегетационного периода, хвоя серая, желтая или красно-бурая, кора частично опала, на стволе, ветвях и корневых лапах часто признаки заселения стволовыми вредителями или их вылетные отверстия	Деревья, усохшие в течение текущего вегетационного периода, листва увяла или отсутствует, ветви низших порядков сохранились, кора частично опала, на стволе, ветвях и корневых лапах часто признаки заселения стволовыми вредителями или их вылетные отверстия
5(б) — свежий ветровал	Деревья, вываленные ветром в текущем году с полностью или частично оборванными корнями, хвоя зеленая, серая, желтая или красно-бурая, кора обычно живая, ствол повален или наклонен с обрывом более $^1/_3$ корней	Деревья, вываленные ветром в текущем году с полностью или частично оборванными корнями, листва зеленая, увяла либо не сформировалась, кора обычно живая, ствол повален или наклонен с обрывом более $^1/_3$ корней
5(в) — свежий бурелом	Деревья со сломанными ветром стволами в текущем году, хвоя зеленая, серая, желтая или красно-бурая, кора ниже слома обычно живая, ствол сломлен ниже $^1/_3$ протяженности кроны	Деревья со сломанными ветром стволами в текущем году, листва зеленая, увяла, либо не сформировалась, кора ниже слома обычно живая, ствол сломлен ниже $^1/_3$ протяженности кроны
5(г) — старый сухостой	Деревья, погибшие в предшествующие годы, живая хвоя (листва) отсутствует или сохранилась частично, мелкие веточки и часть ветвей опали, кора разрушена или осыпалась, частично или полностью, на стволе и ветвях имеются вылетные отверстия насекомых, стволовые вредители вылетели, в стволе возможно наличие мицелия дереворазрушающих грибов, снаружи — плодовых тел трутовиков	
5(д) — старый ветровал	Деревья, вываленные ветром в предшествующие годы, с полностью оборванными корнями, живая хвоя (листва) отсутствует, кора и мелкие веточки осыпались частично или полностью, ствол повален или наклонен с обрывом более $^1/_3$ корней, стволовые вредители вылетели	
5(е) — старый бурелом	Деревья со сломанными ветром стволами в предшествующие годы, живая хвоя (листва) отсутствует, кора и мелкие веточки осыпались частично или полностью, ствол сломлен ниже $^1/_3$ протяженности кроны, стволовые вредители выше места слома вылетели, ниже места слома могут присутствовать: живая кора, водяные побеги, вторичная крона, свежие поселения стволовых вредителей	

Приложение Б
(рекомендуемое)

Буферы, растворы и питательные среды

Б.1 Выделение ДНК

Б.1.1 ЦТАБ-буфер 3 % (100 мл)

Наименование реагента	Количество реагента	Единица измерения
Цетилтриметиламмоний бромид	3,0	г
Натрий хлорид	8,19	г
ЭДТА, динатриевая соль, дигидрат	0,744	г
Трис	1,212	г
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (100 мл)	мл

Б.1.2 Смесь хлороформа и изоамилового спирта
Хлороформ: изоамиловый спирт (24:1 соответственно — работа под вытяжкой)

Б.2 Проведение электрофореза в агарозном геле

Б.2.1 Трис-боратный (TBE) буфер 10-кратный (1 л)

Наименование реагента	Количество реагента	Единица измерения
Борная кислота	55	г
ЭДТА, динатриевая соль, дигидрат	7,4	г
Трис	108	г
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (1 л)	мл

Б.2.2 Трис-ацетатный (TAE) буфер 50-кратный (1 л)

Наименование реагента	Количество реагента	Единица измерения
Ледяная уксусная кислота	57	мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	100	мл
Трис	242	г
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (1 л)	мл

Б.2.3 Раствор бромистого этидия (1 л)

Наименование реагента	Количество реагента	Единица измерения
Исходный раствор 10 мг/мл	1	мл
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (1 л)	мл

После приготовления раствора необходимо его процедить через бумажные фильтры.

Приложение В
(справочное)

Проведение капиллярного электрофореза с использованием генетических анализаторов

В.1 Выделение и очистка ампликонов из агарозного геля с использованием набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (протокол)

Работы по выделению и очистке ампликонов из агарозного геля следует проводить согласно инструкции производителя. Пример проведения операций приведен ниже.

Вырезают фрагменты проб из агарозного геля.

Примечание — При работе следует использовать защитные очки.

Помещают вырезанные фрагменты геля в промаркированные микроцентрифужные пробирки и взвешивают. Записывают результат.

В пробирку с гелем добавляют три объема (в данном случае объем приравнивается к массе фрагмента геля) «Связывающего раствора», но не менее 350 мкл.

Инкубируют смесь при температуре 55 °С до полного растворения геля.

Примечание — Для фрагментов длиной менее 500 п.н. рекомендуется добавить изопропанол в объеме, равному объему геля (1:1). Изопропанол следует добавлять после полного растворения геля.

Перемешивают смесь и весь объем пробы переносят на колонку, предварительно помещенную в собирательную пробирку.

Центрифугируют колонки с пробами при максимально доступных оборотах (согласно инструкции набора) 30 с. Сливают жидкость из собирательной пробирки.

Добавляют на каждую колонку по 700 мкл промывочного раствора.

Примечание — Перед началом работы необходимо приготовить промывочный раствор, согласно приложенной инструкции, добавив к концентрату 95 %-ного этанола.

Центрифугируют колонки с пробами при максимально доступных оборотах (согласно инструкции набора) 30 с. Удаляют жидкость из собирательной пробирки.

Центрифугируют пустые колонки при максимально доступных оборотах (согласно инструкции набора) для максимального удаления «Промывочного раствора» 1 мин.

Колонки перемещают в чистые промаркированные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл.

Наносят дозатором на мембрану колонки по 15 мкл «Элюирующего раствора» или деионизированной воды, инкубируют при комнатной температуре 1 мин.

Центрифугируют колонки с пробами при максимально доступных оборотах (согласно инструкции набора) 1 мин 30 с, после чего удаляют колонки.

Пробирки с готовым элюатом используют в дальнейшей работе или замораживают. Очищенную ДНК хранят при температуре минус 20 °С до одного года.

Примечание — Допускается использование коммерческих наборов для очистки ампликонов от любых производителей.

В.2 Очистка набором

Согласно инструкции, необходимо добавить к пробам по 45 мкл буфера. Тщательно перемешивают смолу на вортексе и быстро добавляют к пробам по 10 мкл. Перемешивают пробы в течение 30 мин на термошейкере при комнатной температуре. Центрифугируют пробы при 1000 *g* оборотах в течение 2 мин. Отбирают 10—20 мкл супернатанта в пробирки или планшет для последующего определения нуклеотидной последовательности на генетическом анализаторе.

В.3 Проведение капиллярного электрофореза с использованием одноканального генетического анализатора

Для исследования используют денатурирующий гель POP-4TM или POP-6 TM или аналоги.

Электрофоретический анализ и детекцию на генетическом анализаторе (секвенаторе) проводят в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией.

Запускают прибор.

Включают прибор и заполняют ячейки «Полимерный» или «Гелевый блок».

Включают прибор и ПК. Запускают ПО — Data collection.

Включают камеры детекции: Data collection>> Window>> Manual control>> Temperature set>> Value 50>> Execute>> Window>> Status.

Устанавливают пробы.

Закрепляют пробы на мягких септах. Нажимают Tray.

Собирают сэндвич и установливают его в автосэмплер. Нажимают Tray. Закрывают дверцы прибора.

Запускают секвенирование:

Data collection>> File>> New>> Sequence sample sheet на 96 образцов>> Sample name (называют образцы, согласно занимаемому месту в штативе)>> Save as>> Закрывают все диалоговые окна для обновления полученной информации>> File>> New>> Injection list>> Выбирают созданный sample sheet (в дальнейшем будет пониматься, как матрикс)>> Выбирают module>> Задают условия электрофореза>> Run.

Завершают работу.

Открывают дверцы прибора. Изымают образцы: Tray>> Разбирают и промывают сэндвич>> Tray. Закрывают и выключают прибор.

В.4 Проведение капиллярного электрофореза с использованием восьмиканального генетического анализатора

Для исследования используют денатурирующий гель POP-6 TM или POP-7 TM или аналоги.

Запускают прибор.

Включают компьютер, затем прибор. Запускают ПО.

В окне Pre-Heat the oven выставляют температуру в 60 °С и нажимают Start Pre-Heat.

В верхней части рабочей панели выбирают Create new plate>> Name_ввести наименование плашки>> Plate Type_Sequencing>> Capillary Length_50 или 36 cm>> Polymer_POP-6 TM или POP-7 TM>> Assign Plate Contents.

Заполняют наименованиями образцов поле виртуальной плашки.

Выбирают в нижней части рабочей панели окно Assays>> Add from library>> выбирают протокол, соответствующий необходимым параметрам (тип анализа, длина капилляра, тип полимера, тип набора BigDye® Terminator)>> Add to plate.

Выбирают окно File name conventions>> Add from library>> Sample Name_Well Position_Capillary Number>> Add to plate.

Выбирают окно Results Groups>> Create new results group>> Name_ввести наименование плашки>> Снимают галочки с Include an Instrument Run Name folder и Include an Injection folder>> Save to Library.

Выделяют все образцы и в каждом из трех нижних окон с протоколами проставляют галочки>> Link Plate for Run>> Start Run.

В.5 Обработка и интерпретация полученных результатов

Обработку и интерпретацию полученных результатов проводят на основании использования программного пакета Sequencing Analysis Software 3.1.1. (Applied Biosystems, США).

Анализ результатов секвенирования производят с использованием ПО SeqA6.

Запускают SeqA6.

Загружают данные: File>> AddSample(s)…>> в диалоговом окне выделяют файлы сырых данных секвенирования с именами образцов, лежащих в папке с именем-датой в директории Runs 1>> нажимают кнопку Add Selected Samples>> Ok.

В открывшемся окне выбирают содержимое ячейки DeySet/Primer — подходящий набор химии и капилляр. Устанавливают галочку в ячейке Show. Нажимают кнопку> (play).

Во вкладке Sequence должна появиться нуклеотидная последовательность образца. После анализа сохраняют последовательности образцов.

Приложение Г
(справочное)

Порядок проведения видовой идентификации

Г.1 Для интерпретации полученных результатов данных геномов выявленной микробиоты применяется база данных NCBI (англ. National Center for Biotechnological Information — национального центра биотехнологической информации) с использованием BLAST (англ. Basic Local Alignment Search Tool — средство поиска основного локального выравнивания). Программы BLAST — семейство компьютерных программ, служащих для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или ее фрагмент. Используя BLAST, исследователь может сравнить имеющуюся у него последовательность с последовательностями из базы данных и найти последовательности предполагаемых гомологов. Является важнейшим инструментом для молекулярных биологов, биоинформатиков, систематиков [13] (приложение 1), [14].

Видовая принадлежность определяется по максимально близкому совпадению полученных последовательностей с депонированными последовательностями с учетом степени сходства.

Г.2 Алгоритм действия

Для начала анализа открывают в браузере [13] (приложение 1).

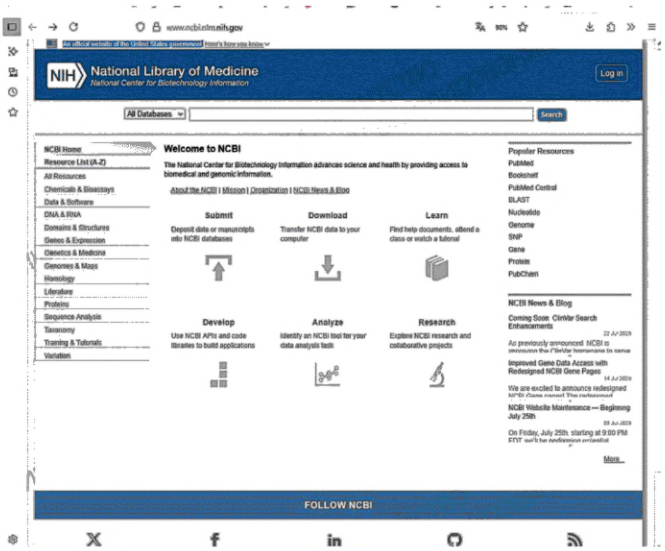


Рисунок Г.1

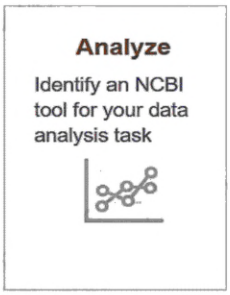


Рисунок Г.2

Выбирают вкладку Analyze или набирают в интернет-браузере web-адрес BLAST [14] для проведения видовой идентификации на основании анализа последовательностей ДНК — (NUCLEOTIDE BLAST) (см. рисунки Г.1, Г.2).

Выбирают вкладку Nucleotide BLAST (см. рисунки Г.3, Г.4).

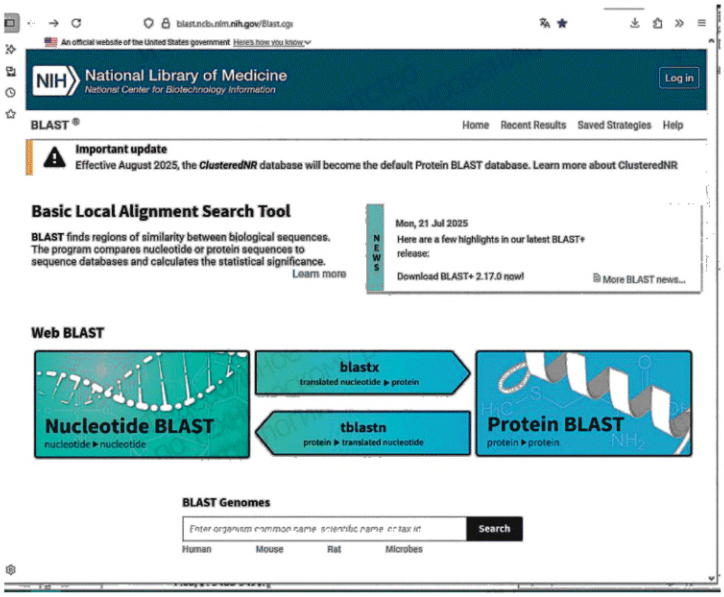


Рисунок Г.3

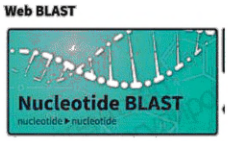


Рисунок Г.4

В открывшееся окно Enter Query Sequence вставляют нуклеотидную последовательность исследуемого образца.

Для примера в качестве объекта исследований используют частичную нуклеотидную последовательность рДНК фитопатогенного ксилотрофного гриба Резинициума двухцветного (*Resinicium bicolor (Alb. & Schwein.) Parmasto*), полученную в ходе секвенирования продукта ПЦР-амплификации с праймерами *ITS1 и ITS4*.

Пример — Результат определения на генетическом анализаторе нуклеотидной последовательности тестируемого образца микрофлоры (см. рисунок Г.5).

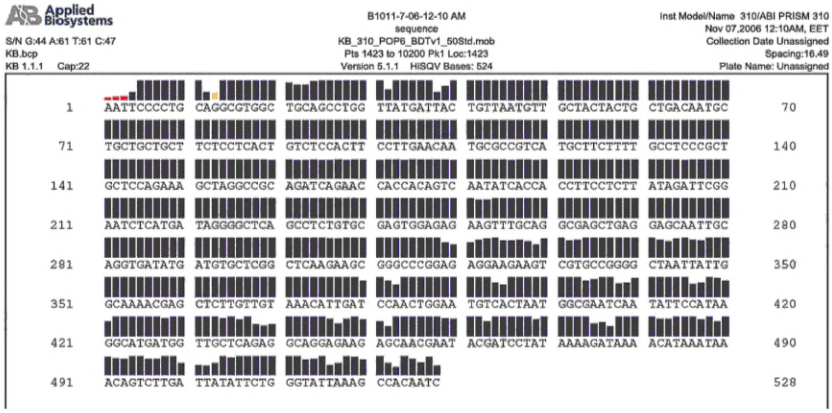


Рисунок Г.5 — Протокол секвенирования ампликона *Resinicium bicolor*

В выпадающем окне Database выбирают Nucleotide collection (nr/nt) и нажимают иконку BLAST. Получают картинку, приведенную ниже (см. рисунок Г.6).

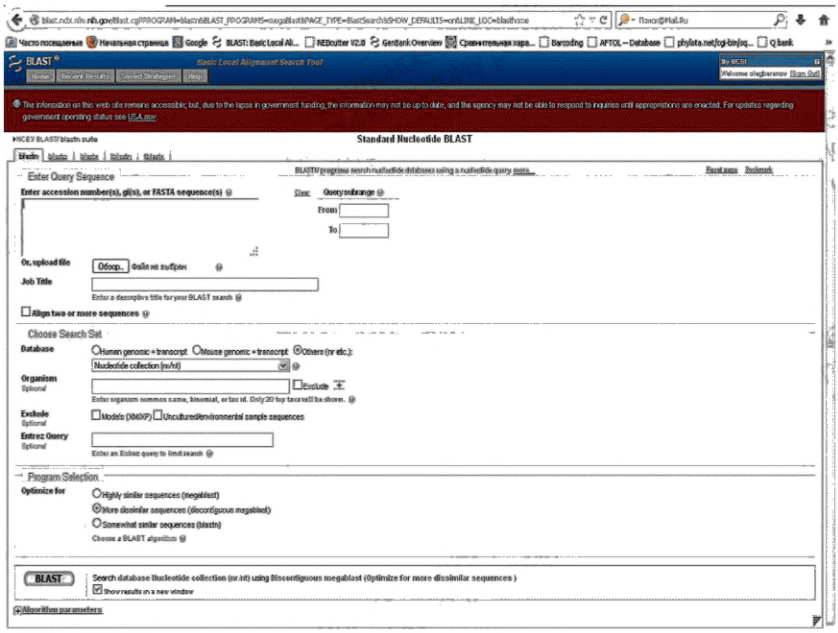


Рисунок Г.6 — Окно ввода регистрационного номера или последовательности тестируемого образца

В интерфейсе находят окно с названием «Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)» куда вставляют тестируемую НК последовательность (см. рисунок Г.7).

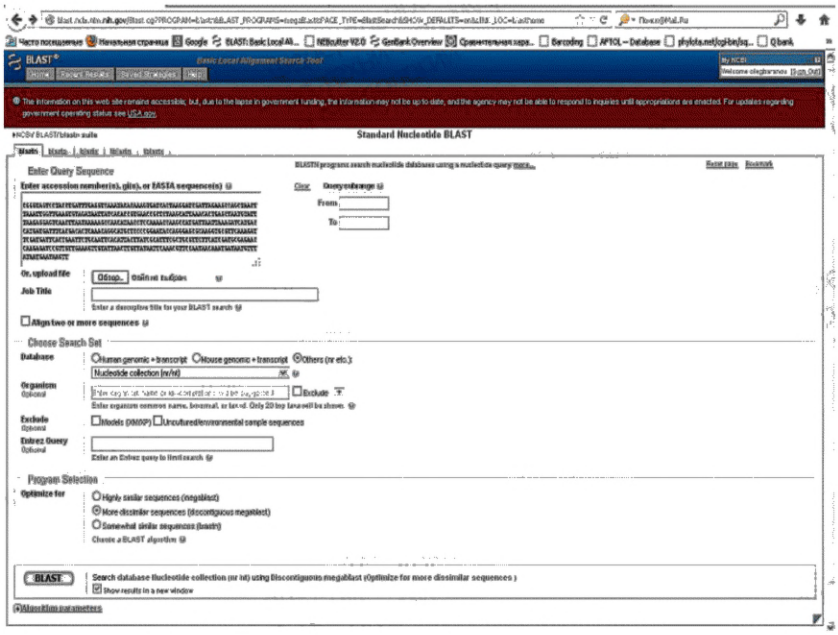


Рисунок Г.7 — Внесенная последовательность тестируемого образца

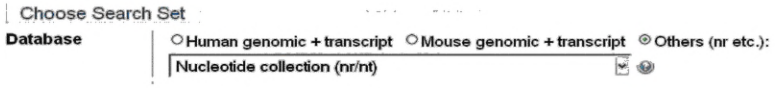


Рисунок Г.8 — Окно выбора баз данных (используют предлагаемую базу по умолчанию)

В следующем окне выбирают систематическую принадлежность обследуемого образца ДНК (грибы, бактерии, насекомые и др.). При отсутствии информации о предполагаемом организме, в параграфе «Organism» оставляют окно неактивным (см. рисунок Г.9).

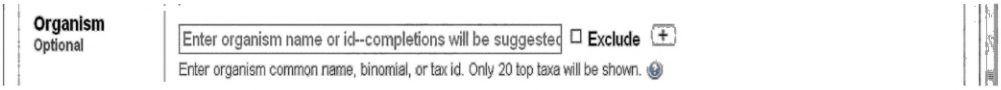


Рисунок Г.9 — Окно выбора типа обследуемого организма

Данный параграф также предполагает введение дополнительной информации о виде организма (как латинский, так английский вариант названия, например, *Pinus sylvestris* или *Scots pine*), для ускорения поиска. Кроме того, в данное окно допускается вносить и другие таксономические категории: род, семейство, отдел, класс и др.). Использование опции «+» позволяет тестировать на схожесть не один, а несколько видов, представленных в базе данных. Кроме того, при наличии предполагаемого вида в базе данных программа при начальном наборе информации будет автоматически предлагать информацию из списка (см. рисунок Г.10).

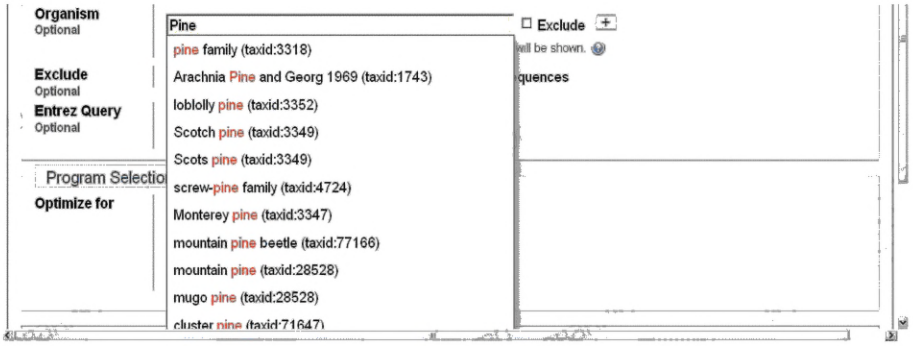


Рисунок Г.10 — Выпадающий список видов организмов

В том случае, когда вы хотите исключить тот или иной вид, или группу видов из анализа, используйте активацию опции «Exclude» (см. рисунок Г.11).

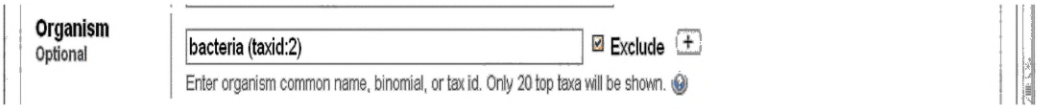


Рисунок Г.11 — Возможность исключения вида организма

Так, например, в данном случае, известно, что данная последовательность не относится к бактериальной (а принадлежит грибному виду *Resinicium bicolor*), в окне вводится информация «bacteria» и активируется опция «Exclude». Это позволяет при проведении анализа исключить из поиска все бактериальные виды. Как ранее указывалось, в случае неизвестных видов, данный параграф «Organism» рекомендуется оставлять неактивным (см. рисунок Г.12).

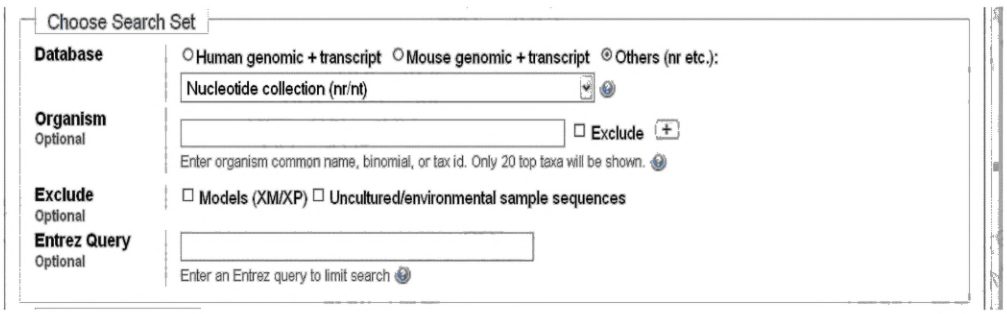


Рисунок Г.12 — Действие при отсутствии предполагаемой информации

Кроме того, при необходимости исключить из поиска все образцы базы данных, для которых не установлена таксономическая принадлежность, можете активировать в параграфе «Exclude Optimal» опции «Exclude Models (XM/XP)» и «Uncultured/environmental sample sequences» (см. рисунок Г.13).

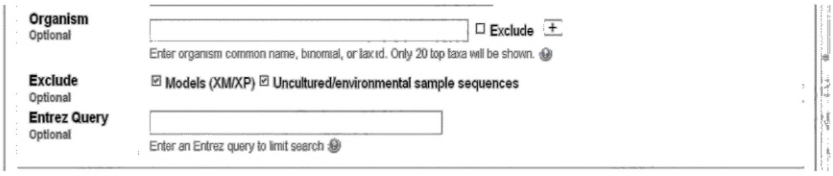


Рисунок Г.13 — Действие для использования большей точности

Также, при наличии интересующего для сравнения номера (кода, шифра) уже депонированного образца (по собственной классификации GenBank), допускается внести его номер в графу «Entrez Query Optional». Данный случай может быть использован, если необходимо провести сравнение вашей ДНК последовательности с каким-то конкретным образцом ДНК (ДНК последовательностью) из базы данных NCBI. При проведении видовой идентификации данная опция остается неактивной.

На следующем этапе анализа выбирают способ анализа «Program Selection». В случае поиска максимально похожих на вашу последовательность образцов из базы данных активируют опцию «Highly similar sequences (megablast)». В ситуациях, когда не выявляются гомологичные последовательности ДНК из базы данных, допускается использовать поиск менее похожих образцов «More dissimilar sequences (discontiguous megablast)» или частично похожих образцов «Somewhat similar sequences (blastn)». В двух последних случаях проведение видовой и родовой идентификации представляется невозможным. В большинстве случаев данными способами допускается определить принадлежность к отделам или классам (см. рисунок Г.14).

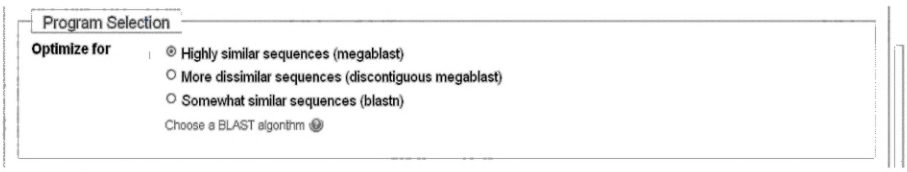


Рисунок Г.14 — Окно выбора степени точности определения принадлежности обследуемого образца ДНК

На последнем этапе для начала поиска необходимо активировать кнопку поиска «Blast» (см. рисунок Г.15).

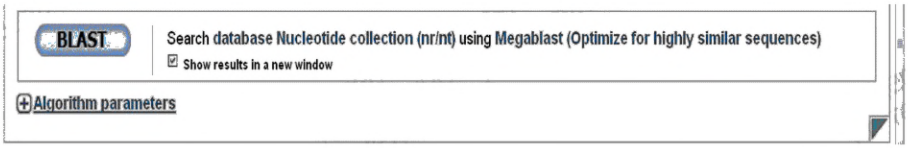


Рисунок Г.15 — Окно активации поиска

Если необходимо визуализировать результаты в отдельном окне браузера, следует активировать опцию «Show results in a new window». В данной части программы присутствует опция «Algorithm parameters», в которой представлены параметры поиска. По умолчанию, параметры поиска настроены менеджерами GenBank наиболее оптимальным способом. Таким образом редактирование параметров поиска рекомендуется проводить только высококвалифицированными специалистами.

В ходе поиска данных на сервере NCBI программа BLAST генерирует промежуточное окно, в котором указывается время до окончания поиска, а также размер введенной нуклеотидной последовательности и ее временный номер (шифр) (см. рисунок Г.16).

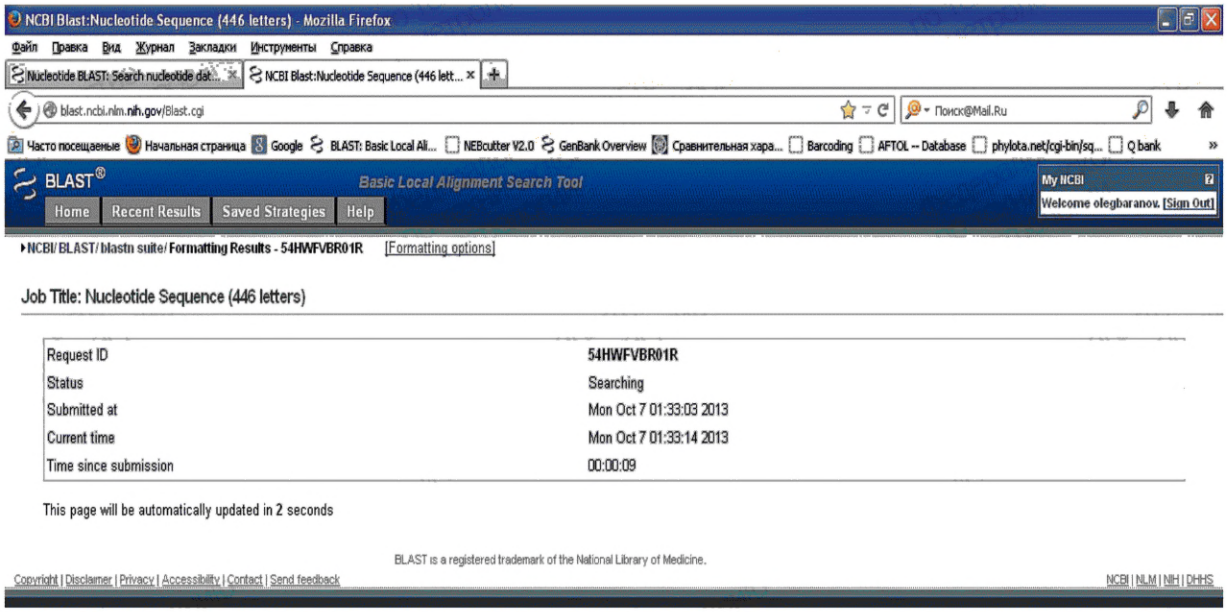


Рисунок Г.16 — Окно отражения поискового процесса

По окончании поиска программой BLAST генерируется окно с результатами поиска, содержащих (по умолчанию) графическое отображение найденных идентичных последовательностей (1); номера депонированных образцов с указанием видового названия и описанием основных параметров сравнения (2); детальное отображение гомологичных нуклеотидных последовательностей для каждого сравниваемого образца из базы данных NCBI (3) (см. рисунок Г.17).

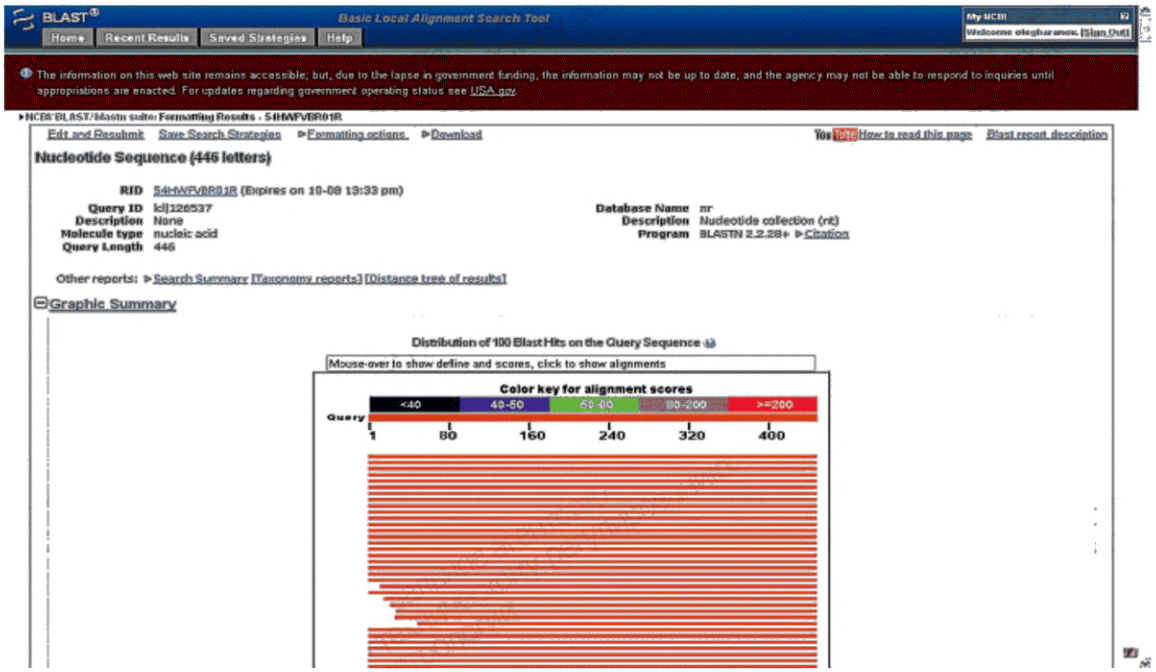


Рисунок Г.17 — Графическое отображение найденных идентичных последовательностей

Полный просмотр всех трех блоков результатов возможен только с использованием полосы прокрутки (см. рисунки Г.18, Г.19).

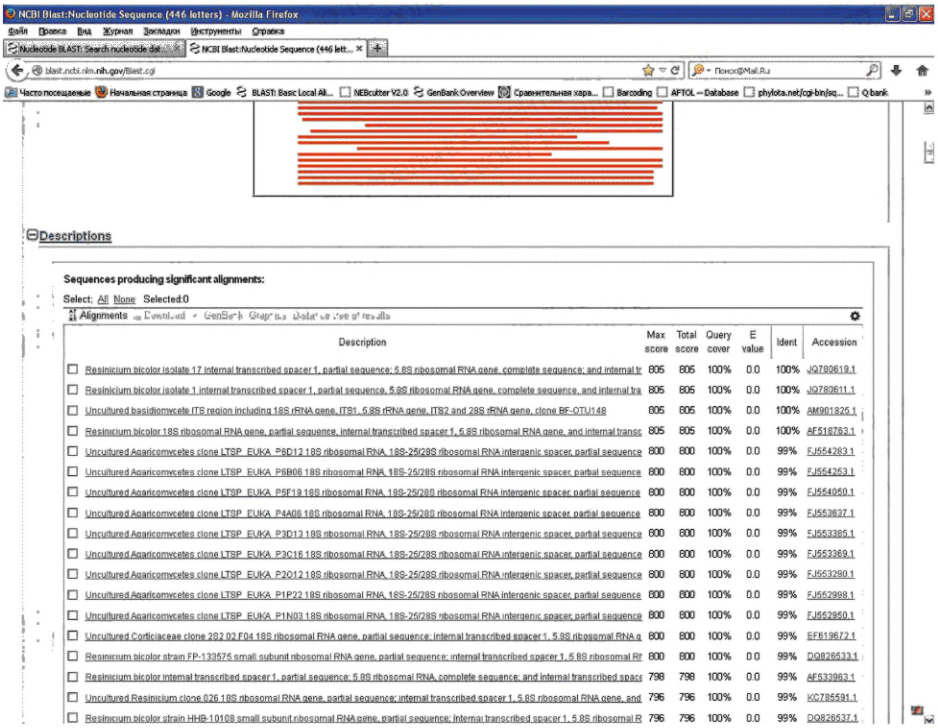


Рисунок Г.18 — Табличное отображение найденных идентичных последовательностей (1)

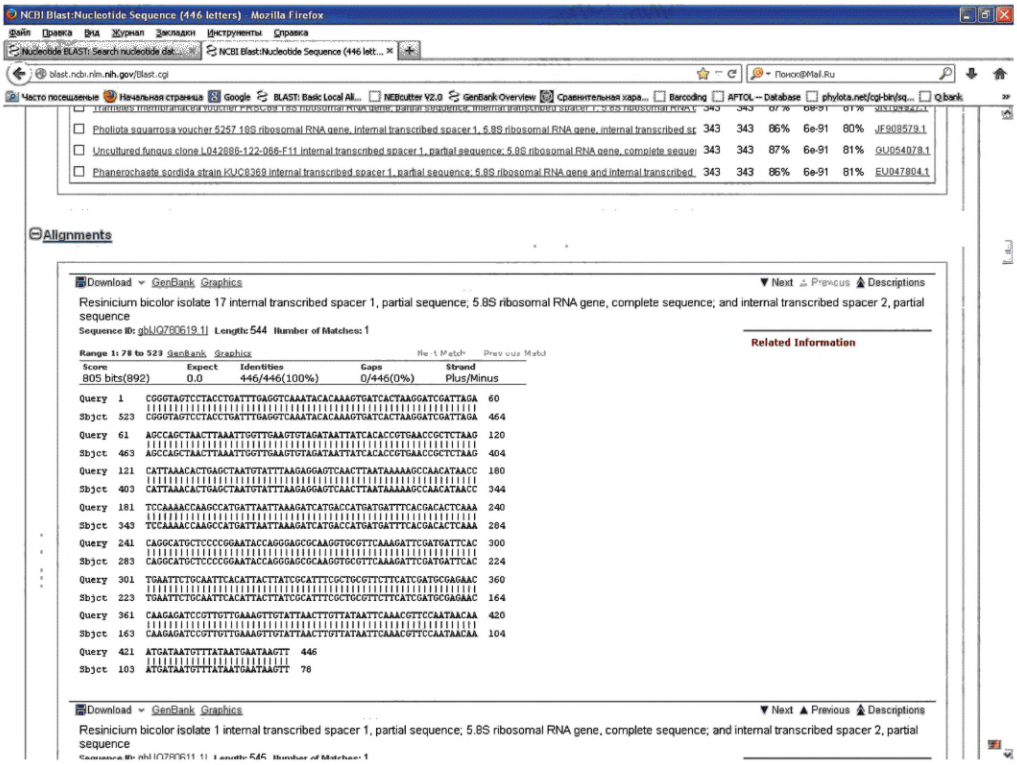
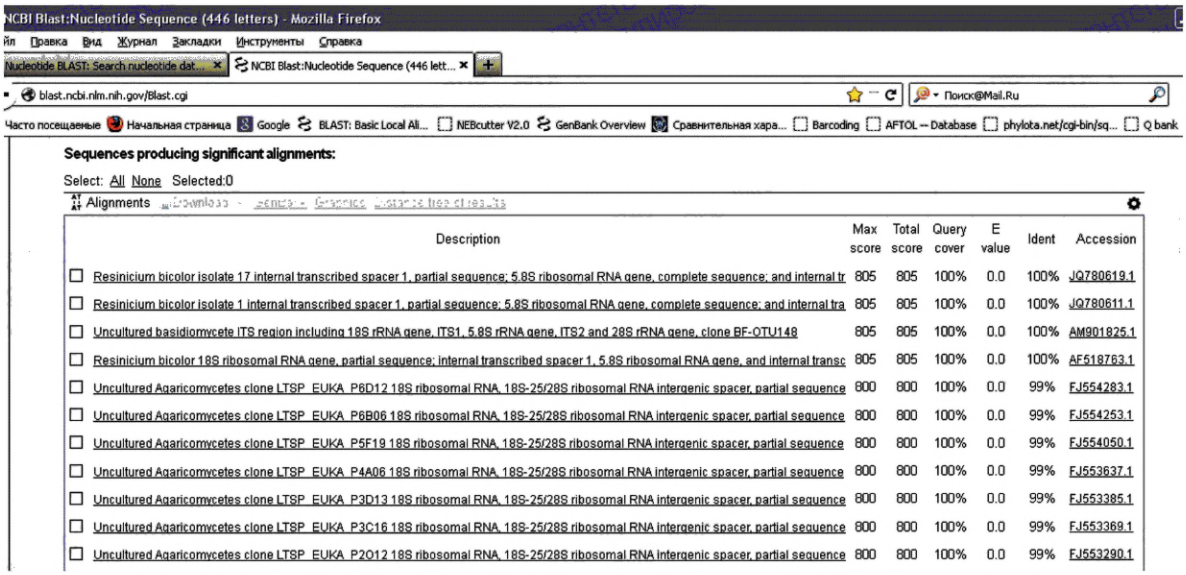


Рисунок Г.19 — Табличное отображение найденных идентичных последовательностей (2)

Общее графическое отображение дает первичную информацию о выявленной гомологичной последовательности, ее целостности и не используется в дальнейшем анализе.

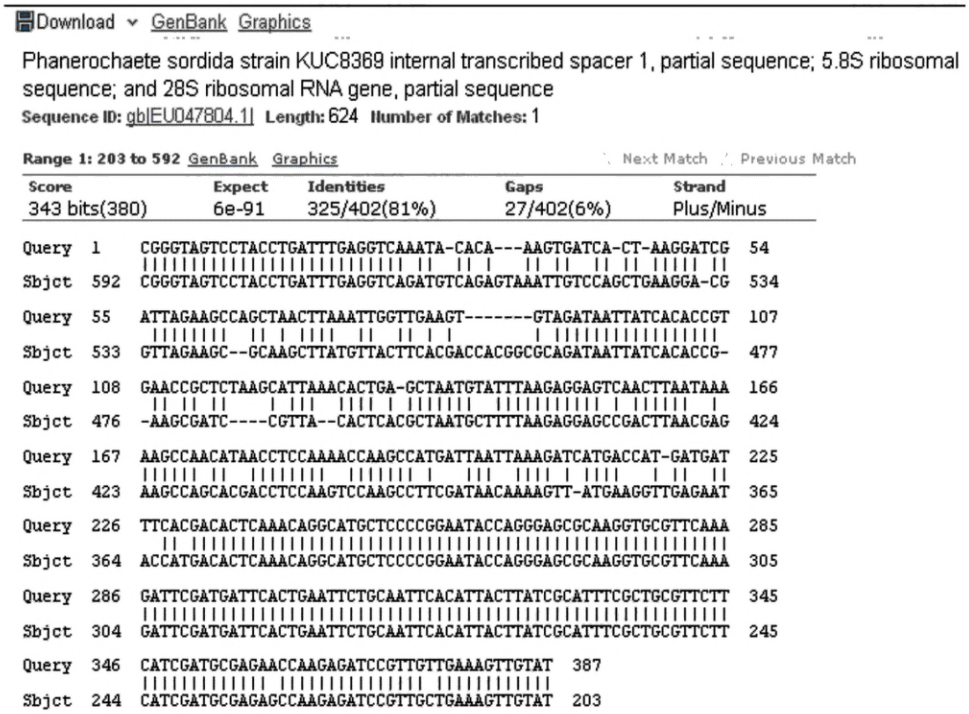
Второй блок позволяет провести видовую идентификацию анализируемой нуклеотидной последовательности (см. рисунок Г.20).



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Resinicium bicolor isolate 17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal tr	805	805	100%	0.0	100%	JQ780619.1
Resinicium bicolor isolate 1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal tra	805	805	100%	0.0	100%	JQ780611.1
Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU148	805	805	100%	0.0	100%	AM901825.1
Resinicium bicolor 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	805	805	100%	0.0	100%	AF518763.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P6D12 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ554283.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P6B06 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ554253.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P5F19 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ554050.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P4A06 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ553637.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P3D13 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ553385.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P3C16 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ553369.1
Uncultured Agaricomycetes clone LTSP_EUKA_P2O12 18S ribosomal RNA, 18S-25/28S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	800	800	100%	0.0	99%	FJ553290.1

Рисунок Г.20 — Второй блок результатов поиска

В данном эксперименте, только четыре образца выявили 100 % сходство с тестируемой последовательностью — «Ident» (идентичность) был равен 100 %. Остальные образцы имели уровень подобия от 99 % и ниже. Кроме того, также важным является и значение показателя «Query cover» в данных четырех образцах оно также составило 100 %. Данный показатель составил 100 % и для еще семнадцати других образцов, для которых показатель «Ident» (идентичность) не превысил 99 %. Показатель «Query cover» указывает на общее внешнее (по размерам границ) подобие депонента NCBI с вашим образцом. Так, например, полученное значение «Query cover» для депонента EU047804.1 (последний в списке) значение 81 %, указывает на то, что только фрагмент анализируемой последовательности размером 343 нуклеотидов (81 %) имеет определенное подобие с образцом EU047804.1 из базы NCBI. При этом совпадает только левая часть последовательности (информация из третьего блока результатов) размером 343 нуклеотида из 402, правая часть из 27 нуклеотидов имеет существенные различия, которые программой BLAST определяются как несоответствующие в значительной степени и не учитываются. При этом сравниваемая левая часть (343 нуклеотидов) также не является полностью идентичной и составляет 81 %, то есть 325 нуклеотидов из 402 только в анализируемой последовательности совпадают (см. рисунок Г.21).



Download GenBank Graphics

Phanerochaete sordida strain KUC8369 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|EU047804.1| Length: 624 Number of Matches: 1

Range 1: 203 to 592 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
343 bits(380)	6e-91	325/402(81%)	27/402(6%)	Plus/Minus

```
Query  1    CGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAATA-CACA---AAGTGATCA-CT-AAGGATCG  54
            ||||||||||||||||||||||||||||| ||  || |   || ||  || || ||||| ||
Sbjct  592  CGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGATGTCAGAGTAAATTGTCCAGCTGAAGGA-CG  534

Query  55   ATTAGAAGCCAGCTAACTTAAATTGGTTGAAGT-------GTAGATAATTATCACACCGT  107
            ||||||||  || | ||||  ||  || | |         | ||||||||||||||||||
Sbjct  533  GTTAGAAGC--GCAAGCTTATGTTACTTCACGACCACGGCGCAGATAATTATCACACCG-  477

Query  108  GAACCGCTCTAAGCATTAAACACTGA-GCTAATGTATTTAAGAGGAGTCAACTTAATAAA  166
             || || ||    | |||  |||| | |||||||  |||||||||||| | ||||||  |
Sbjct  476  -AAGCGATC----CGTTA--CACTCACGCTAATGCTTTTAAGAGGAGCCGACTTAACGAG  424

Query  167  AAGCCAACATAACCTCCAAAACCAAGCCATGATTAATTAAAGATCATGACCAT-GATGAT  225
            |||||| ||  ||||||||  |||||||  |   |||  |||| | ||||   | ||  ||
Sbjct  423  AAGCCAGCACGACCTCCAAGTCCAAGCCTTCGATAACAAAAGTT-ATGAAGGTTGAGAAT  365

Query  226  TTCACGACACTCAAACAGGCATGCTCCCCGGAATACCAGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAA  285
               || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  364  ACCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCCCGGAATACCAGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAA  305

Query  286  GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTT  345
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  304  GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTT  245

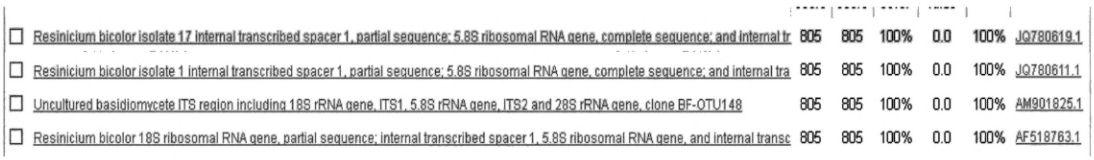
Query  346  CATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAT  387
            |||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  244  CATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAT  203
```

Рисунок Г.21 —Третий блок результатов поиска

Таким образом, для проведения точной идентификации необходимо максимальное значение двух показателей: «Ident» и «Query cover». Кроме того, абсолютная величина сходства образцов «Ident» 100 %/«Query cover» 95 % и «Ident» 95 %/«Query cover» 100 % является равной — 95 %, хотя эти образцы (из базы данных) не будут идентичными и будут различаться по нуклеотидным последовательностям: в первом случае отличия от тестируемого образца будут находиться в краевых частях последовательности, во втором случае в центральных (внутренних).

Кроме того, полная идентичность может иметь место, если сравниваемые последовательности не разбиты на фрагменты (блок 3), а сравниваются одним целым. Поскольку в случае сравнения целого набора последовательностей, взятых из различных фрагментов депонентов NCBI (особенно в случае депонентов с большой длиной прочтения генома) «Ident» и «Query cover» — также могут составить 100 % с тестируемым образцом, однако результаты такого сравнения будут ложноположительными и не будут соответствовать действительности.

Как ранее указывалось, тестируемая нуклеотидная последовательность была гомологична четырем образцам: JQ780619.1 (*Resinicium bicolor*), JQ780611.1 (Resinicium bicolor), AM901825.1 (*Uncultured basidiomycete*) и AF518763.1 (*Resinicium bicolor*). Кроме того, большинство образцов с 99 % идентичностью также имели видовое обозначение *Resinicium bicolor*, или обозначались как базидиальный гриб, для которого не была получена микробиологическая культура (см. рисунок Г.22).



Resinicium bicolor isolate 17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal tr	805	805	100%	0.0	100%	JQ780619.1
Resinicium bicolor isolate 1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal tra	805	805	100%	0.0	100%	JQ780611.1
Uncultured basidiomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone BF-OTU148	805	805	100%	0.0	100%	AM901825.1
Resinicium bicolor 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	805	805	100%	0.0	100%	AF518763.1

Рисунок Г.22 — Пример тестируемой нуклеотидной последовательности

Таким образом, на основании полученных результатов данную последовательность можно идентифицировать как генетический материал *Resinicium bicolor*. Наличие 1 % — 2 % несоответствий (98 % — 99 % схожести) в нуклеотидных последовательностях базы данных NCBI допускается отнести к географической изменчивости вида.

В случае больших отличий (≥3 %) при анализе в качестве маркера транскрибируемых спейсеров рДНК тестируемая нуклеотидная последовательность не является принадлежащей к указанному виду (идентичность ≤97 %), а относится к другому виду данного рода и может быть обозначена как «родовое название + sp.» без указания конкретного вида. Так, в случае резиниция данная последовательность была бы обозначена как *Resinicium sp.*

По мере увеличения различий (≥7 %) уменьшается и таксономическая точность определения (семейство и выше). Точные границы уровня дифференциации различных таксономических групп зависят от типа используемого маркера и систематических особенностей данной группы.

При активировании ссылки «JQ780619.1» база данных представит отдельное окно с дополнительной информацией, связанной с данным депонентом генного банка NCBI: его полное таксономическое описание, имя исследователей, проводивших анализ, научную публикацию, где описан данный изолят или штамм, место отбора образца, растение-хозяин и др. (см. рисунок Г.23).

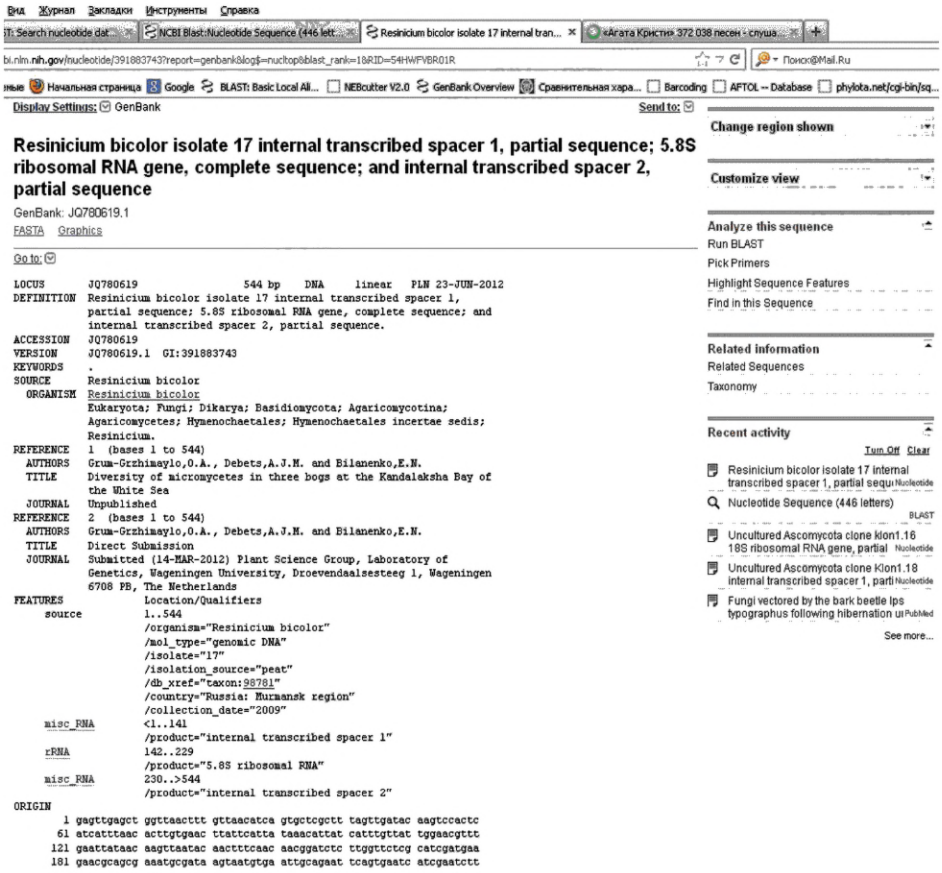


Рисунок Г.23 — Окно дополнительной информации

После завершения анализа получают список видов живых организмов, чьи нуклеотидные последовательности имеют наибольшее сходство с исследуемым объектом.

Во вкладке Descriptions указаны международные научные названия видов на латинском языке.

Сортируют по E value, нажав соответствующую иконку. Чем меньше данная величина, тем более статистически значима установленная гомология.

Видовую принадлежность устанавливают по максимальному проценту величины совпавших нуклеотидов Per. Ident.

Результаты исследований оформляются заключением и записью в журнале. Заключение и запись в журнале удостоверяет лицо проводившее исследование.

Приложение Д
(справочное)

Формы (бланки) заключений по результатам обследования деревьев лесных пород, объектов лесного семеноводства, партий репродуктивного материала, почвы на зараженность фитопатогенными организмами с использованием метода молекулярно-генетического анализа

ФОРМА Заключения
по результатам обследования фитопатологического состояния насаждений
и репродуктивного материала лесных древесных пород с использованием
метода молекулярно-генетического анализа»

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № _____
по результатам обследования фитопатологического состояния
насаждений и репродуктивного материала лесных древесных пород
с использованием метода молекулярно-генетического анализа»

«_____» _____ 20____ г. г. _____

На анализ представлена выборка(и) образцов _____

_____

(русское/латинское наименование вида лесного растения)

Юридический и почтовый адрес сборщика _____

_____

(наименование юридического или ФИО физического лица, заготовившего данную партию)

Телефон/факс _____

Время отбора образцов генетического материала _____,

(день, месяц, год)

Дата поступления образцов для генетического анализа _____

(день, месяц, год)

Характеристика насаждения, где собраны образцы ДНК _____

_____

(естественные насаждения, ЛСП, ПЛСУ...)

Место отбора образцов растительного материала _____

_____

Координаты _____

Тип отобранного генетического материала образца _____

(растительная ткань: хвоя, древесина, лист, почка, семена и т. п.)

Количество образцов _____

(штук образцов растительного материала: хвои, древесины… для выделения ДНК)

Заказчик фитопатологического обследования _____

_____

Результаты генетического анализа _____

№	Наименование породы	Описание объекта исследования и характер повреждения	Место нахождения объекта исследования (координаты)	Результат генетического анализа
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

Выводы

_____

_____

_____

Заключение выдано _____

(полное наименование для юридического лица)

адрес в пределах места нахождения

_____

(для юридического лица) (подпись)

_____

(ответственные за составление паспорта — должность, фамилия, инициалы) (подпись)

ФОРМА Заключения
по результатам обследования почвы на зараженность
фитопатогенными организмами с использованием
метода молекулярно-генетического анализа

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № _____
по результатам обследования почвы на зараженность фитопатогенными организмами с использованием метода молекулярно-генетического анализа

«_____» _____ 20____ г. г. _____

На анализ представлен образец почвы _____
(место отбора образца)
_____

Юридический и почтовый адрес заказчика анализа _____
_____
(наименование юридического или ФИО физического лица, предоставившего образец(ы) почвы)

Телефон/факс _____

Время отбора образца почвы _____,
(день, месяц, год)

Дата поступления образцов для генетического анализа _____
(день, месяц, год)

Характеристика объекта, где собран образец почвы _____
(естественные насаждения, ЛСП, ПЛСУ, др.)

Количество образцов _____
(штук образцов)

Результаты генетического анализа _____

№ образца почвы	Наименование выявленной микрофлоры	Наименование вызываемого заболевания
1		
2		

Выводы _____
_____
_____

Заключение выдано
_____
(полное наименование для юридического лица)

адрес в пределах места нахождения
_____
(для юридического лица)

М.П. Ответственный за составление заключения — ФИО	должность	подпись
М.П. Руководитель — фамилия, имя, отчество	должность	подпись

Библиография

[1] ASTM D1193-06 (2018) Стандартная спецификация для реактивной воды

[2] Difference between mQ water and distilled water /stupid question. — /http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/15937.html

[3] Приказ Минприроды России от 13 мая 2025 г. № 265 «Об утверждении Порядка определения показателей посевных качеств семян лесных растений» (зарегистрировано в Минюсте России 2 июня 2025 г. № 82495)

[4] Приказ Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации от 30 июля 2020 г. № 524 «Об утверждении требований к проведению наблюдений за состоянием окружающей среды, ее загрязнением»

[5] Приказ Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации от 9 ноября 2020 г. № 913 «Об утверждении правил ликвидации очагов вредных организмов»

[6] Мухина М.А., Антропова А.Б., Мокеева В.Л., Биланенко Е.Н., Чекунова Л.Н., Желтикова Т.М. Микромицеты пыльцы березы повислой, лещины обыкновенной и ежи сборной // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. Вып.5. С. 299—308

[7] Постановление Правительства Российской Федерации от 24 декабря 2021 г. № 2464 «О порядке обучения по охране труда и проверки знания требований охраны труда»

[8] Методы молекулярно-генетического анализа/В.Е Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. — Минск: Юнипол, 2007. — 176 с.

[9] Отчет о научно-исследовательской работе «Молекулярно-генетический анализ фитопатогенов в растительном материале заказчика» по договору с ИП Серая Л.Г. №1 от 15 февраля 2018 г.

[10] Sambrook, J. F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed./J. F. Sambrook, D. W. Russell // Cold Spring Harbor Laboratory Press. — 2001. — 2100 pp.

[11] Справочник химика 21 века, Химия и химическая технология. — https://www.chem21.info/page/070132127243204157108210009173137119038153197143/ (дата обращения: 01.09.2023)

[12] Постановление Правительства Российской Федерации от 9 декабря 2020 г. № 2047 «Об утверждении Правил санитарной безопасности в лесах»

[13] База данных NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank (дата обращения: 03.09.2024)

[14] NUCLEOTIDE BLAST URL:http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (дата обращения: 03.09.2024)

УДК 632.9:006.354

ОКС 65.020.20
65.020.99

Ключевые слова: биотехнологии, фитопатологическое состояние, посадочный материал и насаждения лесных древесных пород, ДНК-диагностика, методы оценки

Редактор *Е.В. Якубова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 16.04.2026. Подписано в печать 29.04.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 6,05. Уч.-изд. л. 5,14.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru