



*Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан*

*ТОО «Казахский научно-исследовательский институт  
защиты и карантина растений имени Жазкена Жиембаева»*



*Сборник материалов Международной научной конференции*

## **«Становление и развитие науки по защите и карантину растений в Республике Казахстан»**

*посвященной 60-летию основания института  
и 100-летию научных исследований по защите растений  
в Казахстане*



**6-декабря 2018 г.  
Алматы**



«Маскат» 100%, к/х «Дихан» 99,1%, к/х «Жеміс» 100%, к/х «Жарык» 98,1%, к/х «Суздальева О.В» 96,9%, за весь вегетационный период, в среднем 96,9%.

Соответственно, защитный эффект дезрапторов от повреждения вредителя яблони был существенно высоким, поврежденность плодов снизилась до 1-2%.

В 2018 году получены аналогичные результаты. За время межучетного периода испарялось в основном от 0,03 до 0,91 мг препарата из дезрапторов. Достаточный фон феромона, ориентирующий самцов восточной плодовой яблони, обеспечивал эффект дезориентации до 62,5-100%. Результаты эмиссии дезрапторов в приведены в таблице 3.

По результатам приведенные в таблице 3, в первой половине лета биологическая эффективность дезрапторов была весьма высокая. А во второй половине сезона эффективность составила от 96,3% до 100%, с среднем 98,2%. Испарения дезрапторов за период наблюдений были достаточно интенсивной, так как второй период вегетации был жарким и засушливым.

**Заключение.** Стабильная скорость эмиссии феромонов дезрапторов обеспечивает достаточно высокий уровень дезориентации самцов восточной плодовой яблони. За период 2016-2018 гг. в результате нарушения процессов спаривания и яйцекладки вредителя, поврежденность плодов яблони снизилась до 1-2%, биологическая эффективность дезориентации составила 96,9-100%.

### Список использованных литератур

1 Пятнова Ю.В., Кислицына Т.И., Войнова В.Н., Каракотов С.Д., Плетнев В.А., Вендило В.А., Лебедева К.В., Велчева Н., Станева Е. Испытания феромона восточной и сливовой плодовой яблони для контроля численности методом дезориентации// Защита и карантин растений : науч. журн. для специалистов, ученых и практиков. - 2013. - № 8. - С. 33-35

2 Макеев Г.И., Лысенко Н.А. Некоторые аспекты применения феромонных ловушек восточной плодовой яблони //Сб. науч. Тр. Карантинные вредители, болезни и сорные растения. - М.: Наука, 1991. - ч.1. - С. 58-63.

3 Сметник А.И., Атанов Н.М., Ярышева И.А. и др. Выявление, локализация и ликвидация вредителя восточной плодовой яблони: (Инструкция). - М., 1991. - 27 с.

## МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

**Берганаева Г.Е., Хамдиева О.Х.**

*ТОО «Казахский НИИ защиты и карантина растений им. Ж.Жиембаева»,  
Алматы, Казахстан, [gulzat-bakyt@mail.ru](mailto:gulzat-bakyt@mail.ru)*

Вирусные болезни растений – это серьезный негативный фактор, снижающий биологическую эффективность возделывания плодовых культур во всем мире. Так, по данным научных источников урожайность сортов, пораженных латентными вирусами и фитоплазмами, снижается в среднем на 40–60%. При этом усиливается восприимчивость растений к другим патогенным микроорганизмам. В зависимости от генотипа растения и конкретных условий возделывания эти показатели могут быть как ниже, так и существенно выше. В реальных условиях в качестве критического уровня потерь урожая от поражения вирусами принимается значение порядка 20%, поскольку при более высоких убытках производство уже не рентабельно и производителю приходится уничтожать насаждения [1-3].

Несколько десятилетий назад практически единственным и относительно надежным способом выявления вирусного агента в растительном материале был метод тестирования на индикаторных-индикаторах. Однако он отличался большой трудоемкостью, поскольку для тестирования на древесном индикаторе требовалось проведение двойной прививки. Кроме того, необходимо было содержать большие площади с коллекциями индикаторных растений, и участки



с тестируемыми образцами. При этом сроки проявления характерных симптомов заболевания составляли 1–3 года. Метод биотестирования на травянистых индикаторах сокращает время идентификации вируса до 2–4 недель, но он также довольно дорогостоящий и недостаточно надежный в силу физиологической специфичности индикаторных и тестируемых растений [4, 5]. В настоящее время диагностику проводят различными лабораторными экспресс-методами, выявляя наличие или отсутствие в образце генетического материала возбудителя или специфических антигенов с помощью определенных химических реакций, при этом срок получения результатов составляет несколько часов.

Ключевыми показателями лабораторной диагностики болезней плодовых культур являются чувствительность и специфичность методов выявления возбудителей инфекций (грибов, простейших, бактерий и вирусов).

Чувствительность определяется минимальным количеством материала, которое можно обнаружить данным методом. Материалом могут быть целые микроорганизмы и фрагменты молекул возбудителей, а также специфические антитела. Чем меньше материала способен определить метод, тем выше его чувствительность. Если лабораторное исследование не выявляет присутствующие в образце микроорганизмы, для которых разработана тест-система, то результат называется ложноотрицательным. Чем выше чувствительность метода, тем меньше ложноотрицательных [ложно(-)] результатов.

Специфичность – это способность метода указывать на наличие в образце только того объекта, для выявления которого была разработана тест-система. Если метод указывает на присутствие в образце микроорганизмов, которые там не содержатся, результат называется ложноположительным. Чем выше специфичность метода, тем меньше ложноположительных [ложно(+)] результатов.

Методы способные непосредственно напрямую выявлять возбудителей инфекций из материала, входящий в состав возбудителя, или им продуцируемый (обычно это антигены или генетический материал), представляют для исследователя наибольший интерес (таблица 1).

Таблица 1 – Методы лабораторной диагностики

Методы	Принцип метода	Специфичность	Чувствительность
Микробиологический	Выделение чистой культуры возбудителя	100% «золотой стандарт» лабораторной диагностики	1 000–10 000 кл/мл
Цитологический (микроскопия)	Исследование окрашенных мазков	20–80%	1 000–100 000 кл/мл
Иммуноцитологический и серологический	Выявление антигенов после связывания с антителами РИФ, ИФА	70–90%	1 000–100 000 кл/мл
Молекулярно-биологический	Определение специфического участка ДНК/ РНК в геноме возбудителя	99–100% приравнивается к «золотому стандарту»	200 кл/мл (1 клетка в реакции)

Как видно из таблицы 1 сегодня большинство методов диагностики болезней плодовых культур основано на обнаружении специфических антигенов (иммунохимические методы) или нуклеиновой кислоты (молекулярные методы).

В лабораторной диагностике болезней плодовых культур доминируют методы иммуноферментного анализа (ИФА), различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР), молекулярно-гибридизационный анализ (МГА), поскольку отличаются от других высшими



чувствительностью, специфичностью и производительностью. Рассмотрим указанные методы анализа подробнее.

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** является одной из модификаций серологической диагностики и наиболее высокочувствительным методом, который позволяет получать количественные оценки. В его основе лежит специфическое распознавание поверхностных антигенов вируса антителами, в присутствии ферментов. Данный метод широко используется на практике для идентификации вирусов сельскохозяйственных культур, подходит для серийных анализов. С 1976 г. с помощью ИФА успешно определяют различные фитопатогенные вирусы. Разработано несколько модификаций метода, например Рихтером с соавторами [6].

Первый этап ИФА – адсорбция антител на поверхности носителя, которые связывают соответствующие антигены из исследуемого раствора. Фиксированный на носителе комплекс антиген-антитела обнаруживают путем добавления антител, меченных ферментом. Затем с помощью подходящего субстрата можно обнаружить комплекс антитела-антиген-меченые антитела.

Субстратом служит пара-нитрофенилфосфат, а ферментом-меткой – главным образом щелочная фосфатаза, которую с помощью глутаральдегида конъюгируют с фракциями конъюгатов или очищенными антителами. Таким образом, проявление иммунологической реакции связано с активностью фермента, выражающейся в расщеплении субстрата. Действие фермента заметно даже при малых его количествах, поэтому метод обладает высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать антиген либо антитела в минимальных концентрациях.

Методика проведения ИФА в модификации Рихтера с соавторами состоит из следующих этапов:

\* в лунки на налете из прозрачного поливинилхлорида вносят по 200 мкл раствора фракции конъюгатов (иммобилизованные антитела) с коэффициентом седиментации 7S в 0,05 M фосфатном буфере с pH 9,6 и инкубируют 3 ч при 37°C (рисунок 1А)

\* лунки промывают 4 раза фосфатным буфером с NaCl (PBS) и 0,05% твина 20, затем с лалет промывают капли раствора;

\* вносят по 200 мкл гомогената исследуемых проб (АГ-антиген) (в PBS с твином и 2% поливинил-пирролидона), разбавленного, как указано ниже; инкубация в течение 18 ч при 4°C (рисунок 1Б);

\* лунки промывают, как указано выше;

\* вносят по 200 мкл раствора меченных ферментом антител и инкубируют 4 ч при 37°C;

\* лунки промывают, как указано выше (рисунок 1В);

\* вносят по 300 мкл субстрата (0,06%-ный раствор р-нитрофенилфосфата в 10% фосфатного буфера, pH 9,8);

\* инкубируют при комнатной температуре;

\* реакцию останавливают через 80 мин путем добавления 50 мкл 2 и NaOH.

Реакцию обнаруживают по изменению окраски субстрата. Щелочная фосфатаза, конъюгировавшая с антителами, расщепляет р-нитрофенилфосфат с образованием желтого р-нитрофенола (рисунок 1Г). Степень окрашивания зависит от концентрации вируса в образце. Такие реакции проводят визуально или с помощью спектрофотометра с измерителем экстинкции в длине волны 405 нм.

Помимо высокой чувствительности преимущество ИФА состоит в том, что он пригоден для диагностики вирусов любой морфологии. При наличии соответствующего оборудования один анализ может проанализировать за рабочий день примерно 1000 проб.

Несмотря на все преимущества, существуют также недостатки метода ИФА. Основным недостатком считается то, что он позволяет распознать иммунную реакцию растения на возбудитель, а никак не сам возбудитель. При диагностике инфекционных болезней нет возможности случайно найти возбудителя и определить его иммуноферментные свойства. Тест только указывает на наличие антител.



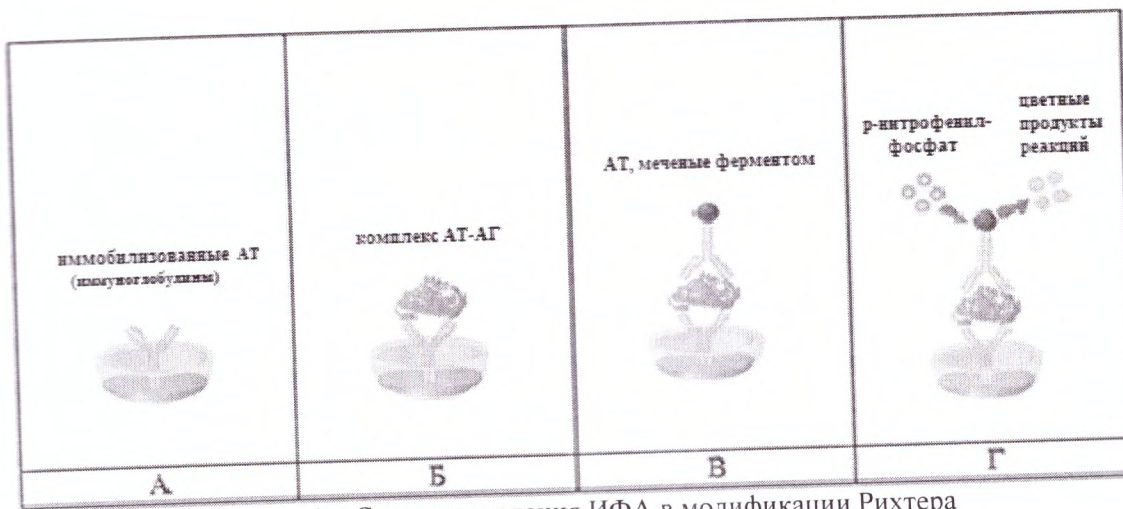


Рисунок 1 – Схема проведения ИФА в модификации Рихтера

**ПЦР-диагностика.** Принципы метода ПЦР были впервые предложены профессором Г. Корана в 1971 г. Сам метод ПЦР был разработан К. Мюллисом в 1983 г. [7, 8].

В основе данного метода лежит способность ДНК-полимераз, осуществлять направленный синтез второй – комплементарной цепи ДНК по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Повышая температуру, можно добиться остановки реакции и последующей денатурации полученной ДНК, т. е. разделения цепей полученной в ходе реакции двуцепочечной ДНК. Если в реакционной смеси присутствует избыток праймера, то значительно снизив температуру, чтобы праймер мог вновь связаться с тем же самым комплементарным участком ДНК, и, добавив новую порцию фермента, можно вновь установить температуру, необходимую для реакции полимеризации, и таким образом, проведя реакцию еще раз, увеличить количество ранее полученного продукта. Многократное, или циклическое, повторение этой процедуры позволяет наработать значительное количество копий участка ДНК, начинающегося с данного праймера.

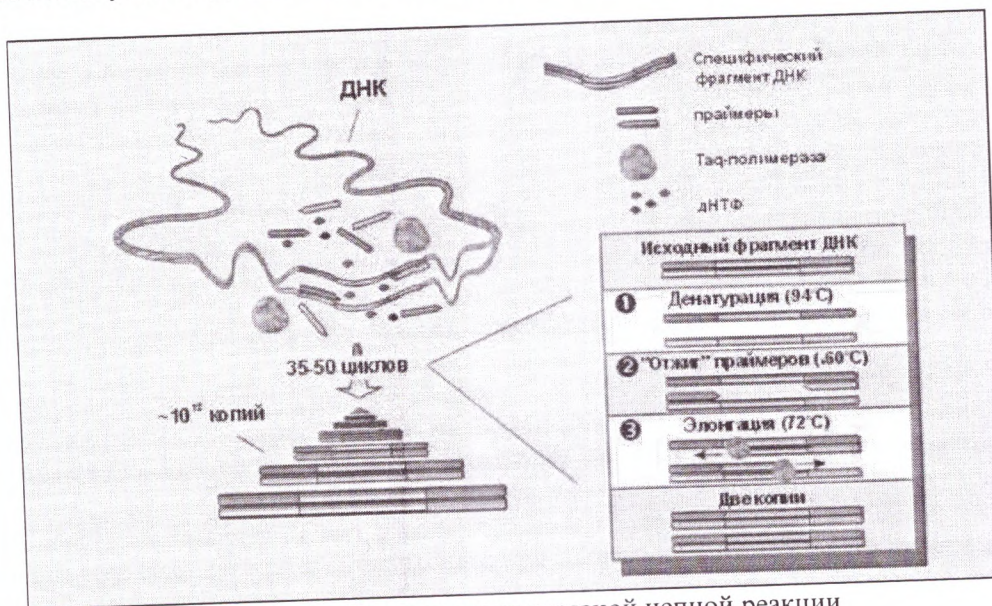


Рисунок 2 – Принцип полимеразной цепной реакции (<http://www.gmpua.com/Biotechnology/UA/Ref/PCR.htm>)

Собственно не просто ДНК использования реакционную с температурой. Присутствие микробактерий (Tag-гидролиз), и их ферментов позволило проводить каждый цикл температурно-вещного цикла.

На рисунке 1 показан процесс амплификации антигенов диагностического агента и нуклеиновой кислоты. Благодаря своей способности обходить иммунологические барьеры, обходимо культивировать микроорганизмы. При этом приходится сталкиваться с проблемой амплификации продукта регистрации. В настоящее время существует несколько типов ПЦР:

- классическая
- ПЦР с праймерами
- мультипраймерная
- ФЛЭШ-ПЦР
- ПЦР с детекцией

**Классическая ПЦР** поддерживается с помощью амплификации синтеза комплементарных цепей. В настоящее время одноцепочечная ДНК является традиционной матрицей. На первом этапе происходит денатурация матрицы. В результате образуется две одноцепочечные ДНК. На втором этапе происходит отжиг праймеров. На третьем этапе происходит элонгация. В результате образуется ДНК. После 30 циклов.

Данный метод исследования, основанный на амплификации ДНК, позволяет выявлять следы генетического материала.



Собственно как метод ПЦР возникла, когда в описанном выше процессе стали использовать не просто ДНК-полимеразу, а так называемую термостабильную ДНК-полимеразу. В начале использования метода после каждого цикла нагревания–охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре. Процедура была неэффективной, требовала много времени и фермента. Затем метод существенно модифицировали за счет использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий (Taq-полимераза). Эти организмы в ходе эволюции приспособились к жизни в горячей воде, и их ферменты наиболее эффективно функционируют при температуре выше 70°C. Это позволило проводить реакцию копирования ДНК без добавления свежей порции фермента после каждого цикла и использовать для работы специальные приборы-термостаты с меняющимися температурно-временными режимами – термоциклеры или амплификаторы ДНК [8].

На рисунке 2 представлен принцип полимеразной цепной реакции.

Таким образом, в отличие от традиционных и серологических методов анализа, дающих только опосредованное свидетельство наличия инфекции (например, сведения о наличии белков-антигенов диагностируемых патогенов), метод ПЦР напрямую доказывает присутствие возбудителя инфекции, специфически выявляя наличие конкретной последовательности нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) обнаруживаемого патогена. Кроме того, метод ПЦР, благодаря своей высокой чувствительности, позволяет выявлять единичные копии геномов патогенов, обнаруживая тем самым их наличие тогда, когда другими методами (микробиологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать практически невозможно. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и скрыто существующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях. Кроме того, использование метода ПЦР позволяет значительно сократить время анализа образца. За счет автоматизации процесса амплификации занимает всего 1-2 часа, а с учетом предшествующей пробоподготовки и экстракции результатов анализа, весь процесс занимает не более 4-6 часов. Помимо всего выше перечисленного, существенным достоинством метода является возможность осуществлять количественное определение возбудителя в модификации метода ПЦР в реальном времени [9].

В настоящее время наиболее широко распространены и активно применяются следующие типы ПЦР:

- классическая ПЦР с системой гель-документации (ПЦР);
- ПЦР с постановкой обратной транскрипции (ОТ-ПЦР);
- мультиплексная ПЦР;
- Ф.ТЭШ-ПЦР;
- ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

**Классическая ПЦР, ОТ-ПЦР.** Как известно, вирусы плодовых растений являются РНК-содержащими структурами. Поэтому в формате классической ПЦР с детекцией результатов амплификации в агарозном геле обязательно присутствует этап обратной транскрипции, или синтеза комплементарной ДНК на матричной РНК, извлеченной из тканей растения. Другими словами одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя классическую ПЦР.

На первом этапе комплементарная ДНК образуется на матрице м-РНК из дНТФ ферментом обратной транскриптазой. Компоненты реакции смешиваются с ДНК-праймером и буфером с обратной транскриптазой на один час при 37°C. После того как обратная транскрипция закончена синтезирована ДНК на матрице м-РНК, следующие циклы производятся по стандартной методике ПЦР. После 30 циклов амплификации образуются миллионы копий нужной последовательности нуклеиновой кислоты.

Данный метод ПЦР находит широкое применение в молекулярной биологии и клинических исследованиях, где его можно применять для детектирования инфекционных агентов, генетических маркеров, а также опосредованно для выявления белков в малом количестве.



**Мультиплексный ПЦР.** При мультиплексной (мультипраймерной) ПЦР в одной и той же реакционной среде происходит процесс коампликации нескольких ДНК-овых матриц с участием нескольких пар праймеров. Это позволяет одновременно диагностировать несколько патогенов в одном эксперименте. Важно убедиться, что праймеры для мультиплекс-ПЦР не комплементарны друг к другу, и подобрать условия анализа, которые подходят для равномерного отжига всех участвующих в реакции праймеров, чтобы обеспечить одинаковый выход амплифицируемых продуктов. Кроме того, при анализе результатов методом электрофореза необходимо, чтобы ПЦР-продукты, образующиеся при амплификации ДНК из разных патогенов, имели различный размер. В настоящее время анализы на основе мультиплекс-ПЦР наиболее часто применяют в фитопатологии при комплексной диагностике фитоплазм, нематод, а также вирусов и вирионов.

**ФЛЭШ-ПЦР.** Метод ПЦР в модификации ФЛЭШ (FLASH – Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization) основан на флуоресцентной детекции результатов ПЦР в закрытой пробирке непосредственно после проведения амплификации, что исключает возможное загрязнение образца ампликонами. При этом отсутствует стадия анализа продуктов ПЦР методом электрофореза и гель-документирование. Одно из преимуществ ФЛЭШ-ПЦР – высокая технологичность и относительная дешевизна, так как по стоимости оборудования она сравнима с гель-электрофорезом, но при этом во много раз дешевле ПЦР-РВ.

**ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** По сути это усовершенствованный метод ФЛЭШ-ПЦР. В отличие от большинства других форматов ПЦР, он позволяет не только констатировать факт присутствия ДНК целевого патогена, но и измерить её количество в режиме реального времени по мере накопления продуктов амплификации.

Сегодня ПЦР-РВ – это самый передовой и максимально автоматизированный способ диагностики патогенов, исключающий этап пост-реакционных манипуляций с образцами, что способствует сокращению времени анализа и упрощению организации ПЦР-лаборатории. Амплификация и детекция результатов происходит автоматически после каждого цикла амплификации в закрытой пробирке с реакционной смесью. Таким образом, исключается риск контаминации продукта генетическим материалом из окружающей среды и риск кросс-контаминации другими образцами.

Технически метод ПЦР-РВ позволяет осуществлять мультиплексную диагностику сразу нескольких возбудителей в одном образце к-ДНК, синтезированной по тотальной м-РНК растения. ПЦР-РВ эффективен и удобен для диагностики наиболее патогенных вирусов плодовых культур, таких как шарка сливы, в том числе с возможностью мультиплексной диагностики с идентификацией разных штаммов [11, 12]. Есть данные об успешном проведении мультиплексной ПЦР-РВ для идентификации четырех возбудителей фитофторозов малины с использованием четырех видоспецифичных зондов на основе разных флуоресцентных красителей [13-15]. При комплексном поражении персика вирусами хлоротической пятнистости листьев яблони и зеленой кольцевой пятнистости, ПЦР-РВ с отдельным количественным анализом каждого патогена в листьях, коре и цветках также оказался наиболее эффективным диагностическим приемом [16]. С успехом данный метод применяли для детекции десяти вирусов винограда [17]. Практически на всех экономически наиболее значимых плодовых культурах (яблони, груша, слива, вишня) ПЦР-РВ позволяет с высоким уровнем достоверности выделять зараженные растения и определять генетическую принадлежность возбудителя заболевания к определенной таксономической группе.

**Молекулярно-гибризационный анализ (МГА)** или как называют его еще *методом гибридизации нуклеиновых кислот* – имеет большое преимущество перед остальными системами идентификации, прежде всего, в тех случаях, когда по разным причинам изменено внешнее проявление диагностического признака, так как в генетическом материале очень редко происходят столь большие изменения, которые бы привели к ложноотрицательному результату.

Для проведения анализа синтезируют одноцепочечный ДНК- или РНК-зонд, комплементарный специфическим нуклеотидным последовательностям возбудителя. Зонд метят изотопом, ферментом или другой легко распознаваемой меткой. Исследуемый материал подвергается обработке с целью лизиса микроорганизмов, находящихся в биопробе, выделения и

денатурации количества мРНК. Реакция может быть проведена в качестве условия стандартной гибридизации в пробирке [18].

Разработаны методы обнаружения носителя. Гибридизация образца сорбента с одноцепочечным зондом и нагревание. С помощью других методов определяют концентрации нуклеиновых кислот. Если анализируют пробы из окружающей среды, то чем больше тестируемой среды, тем лучше результаты удаляются от фонового сигнала.

Результаты определяются по интенсивности сигнала (репортера). С помощью методов обнаруживают радиоактивные зонды (P<sup>32</sup> - 14,5 суток периодом по радиоавтографу в лаборатории. При применении методов обнаружения мРНК.

Наиболее распространенный метод обнаружения нуклеиновых кислот не является селективным. Метод основан на использовании биотин-авидин-бiotин-авидин-биотинового комплекса. Биотин связывается с авидином, а авидин – с биотинизированными зондами. Это повышает чувствительность метода, применяемого для обнаружения нуклеиновых кислот.

Последней разработкой является метод обнаружения нуклеиновых кислот с помощью коротких олигонуклеотидов. Синтетические олигонуклеотиды для детекции нуклеиновых кислот имеют специфическую последовательность. Возбудители микроорганизмов отличаются по последовательности нуклеиновых кислот.



концентрации ДНК. Далее проводят инкубацию зонда с исследуемым образцом и измерение количества меченой ДНК, вступившей в гибридизацию с ДНК, находящейся в исследуемой пробе. Гибридизация может происходить как на твердофазных сорбентах, так и в растворе, но обязательным условием становится отмывка несвязавшихся количеств меченого зонда. Чувствительность метода гибридизации нуклеиновых кислот уступает таковой ПЦР и составляет 10<sup>3</sup> микроорганизмов в пробе [18].

Разработаны два способа гибридизации: в растворе или с использованием нерастворимого носителя. Гибридизация на носителях применяется значительно шире. Так ДНК тестируемого зонда сорбируют на нитроцеллюлозной (реже на нейлоновой) мембране. Чтобы разделить цепи одноцепочечной молекулы ДНК, мембрану с иммобилизованной ДНК обрабатывают щелочью или метанолом. Сайты связывания на мембране, оставшиеся свободными, блокируют с помощью ДНК других организмов. Затем, мембрану при определенной температуре (обычно при 65°C) и концентрации солей инкубируют в растворе, содержащем зонд. Этот зонд представляет собой меченые одноцепочечные ДНК или РНК, несущие радиоактивную или нерадиоактивную метку. Если анализируемая ДНК содержит комплементарные последовательности, зонд связывается с ней. Чем больше количество последовательностей, комплементарных зонду присутствует в исследуемой ДНК, тем выше степень связывания зонда. Не связавшиеся молекулы зонда удаляются отмыванием [19].

Результаты гибридизации могут быть обнаружены различными способами, которые зависят от типа метки, ковалентно связанной с зондом (так называемой молекулы-зонда). Сначала в качестве метки использовали изотоп фосфора ( $P^{32}$ ), а результаты регистрировали методом автордиографии по затемнению рентгеновской пленки. Недостаток радиоактивных зондов – их нестабильность из-за непродолжительного времени жизни изотопов ( $P^{32}$  – 14,5 суток) и быстрого радиолитического распада зонда. Использование изотопов с более продолжительным периодом полураспада приводит к снижению чувствительности и удлиняет время для автордиографии. Кроме того, для работы с изотопами необходимы специально-оснащенные лаборатории. Таким образом, радиоактивность метки была причиной весьма ограниченного применения метода гибридизации в области прикладной диагностики болезней растений.

Наиболее широко используют нерадиоактивное мечение – метод биотинилирования зонда, основанный на присоединении к зондам остатков биотина [20]. Биотин (витамин Н), широко распространенный в природе и синтезируемый кишечными микроорганизмами, сам по себе не является, но он обладает высоким сродством с авидином (стрептавидином). Авидин – белок яичного белка, связывающий биотин с образованием нерастворимого комплекса авидин-биотин. Используя биотинилированный фермент и зонд, несущий один или несколько остатков биотина, можно осуществить ферментативную детекцию связанного с мишенью зонда. Зонд связывается с образовавшимся комплексом из двух гомологичных цепей ДНК и связывает биотинилированный фермент, который выявляют с помощью соответствующего субстрата. Метод обладает более низкой чувствительностью, чем радиохимический. Чтобы повысить чувствительность можно, увеличив число остатков биотина, введенных в зонды. Кроме того, применяют хемилюминесцентные или флуоресцентные зонды, свечение которых регистрируют на рентгеновской пленке.

Последовательности, используемые в качестве зондов, могут быть получены из геномов организмов и вирусов или синтезированы химически. Синтетические зонды – короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, обычно содержащие 20-40 оснований. Синтетические олигонуклеотиды, особенно в комбинации с ПЦР, занимают важное место в диагностике фитопатогенов, так как с их помощью разрабатывают расо- и штамм-специфические тесты для детекции дифференциации близкородственных рас или штаммов, а также относительно специфические тесты, позволяющие определить принадлежность патогена к определенному виду. Возможности точной видовой и внутривидовой идентификации возбудителей, а также возможность и надежность определения заболевания с помощью олигонуклеотидных зондов, зависят во многом от того, как увеличивается число секвенированных геномов фитопатогенных организмов и вирусов.



Однако, диагностика, основанная на гибридизации нуклеиновых кислот с зондами, имеет ряд ограничений в отношении чувствительности, кроме того, она требует довольно много времени и усилий. Для ее проведения необходимо располагать достаточным количеством ДНК. Процесс гибридизации невозможно полностью автоматизировать.

**Метод дот-гибридизации** применяют в случаях, когда необходимо установить наличие или отсутствие в ДНК выявляемой последовательности. В этом случае очищенную денатурированную ДНК наносят непосредственно на фильтр, иммобилизуют, гибридизируют с зондом и регистрируют на автографах положительные сигналы [19].

**Заключение.** В настоящее время в лабораторной диагностике вирусных болезней растений доминируют методы диагностики, основанные на полимеразной цепной реакции, которые являются наиболее эффективным способом детекции целевой ДНК/РНК патогена в анализируемых образцах даже в начальных стадиях заболевания, при бессимптомном его течении. ПЦР-анализы позволяют быстро и точно диагностировать комплексы вирусов на растении. Следует также отметить, что метод иммуноферментного анализа (ИФА) и молекулярно-гибридизационный анализ (МГА) также отличаются высокой чувствительностью, специфичностью и производительностью.

### Список использованной литературы

- 1 Cembali T., Folwella R.J., Wandschneider P., Eastwell K.C., Howell W.E. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US // Crop Protection. – 2003. №22. – P.1149–1156.
- 2 State Level Model Regulatory Standard: Virus-Tested Certification Program for *Prunus*, *Malus*, *Pyrus*, *Chaenomeles*, and *Cydonia* Nursery Stock Production Systems. - 2012. – US, Washington. National Plant Clean Network Fruit Trees – 19 p.
- 3 Lal A., Pant M., Rani A. The who's who of plant viruses: a cognitive approach // Asian J. Pharm. Clin. Res. – 2015. - Vol. 8, Issue 1. - P.60-68.
- 4 Кеглер Х. Борьба с вирусными болезнями растений. – М.: «Агропромиздат», 1986. – 480 с.
- 5 Приходько, Ю.Н. Вирусы семечковых и косточковых культур. - Воронеж: ИПЦ «Научная книга», 2011. – 468
- 6 <http://agrohimija.ru/opredelenie-bolezney-i-vrediteley/1865-immunofermentnyy-analiz-ifa.html>
- 7 Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. – 6-е издание – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015 – 223 с.
- 8 Кутлунина Н. А., Ермошин А. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учеб.-метод. пособие. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.
- 9 <http://www.awtec.ru/articles/2016-shornikov-gorelov-molekulyarn-met-diagn-bol-pl-kelt.pdf>
- 10 Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
- 11 Jarošová J., Gadiou S., Kumar J.K. Real-time RT-PCR quantitative analysis of plant viruses in stone fruit tissues // 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, July 5 – 10. - Neustadt, Germany, 2009. – P.61-64.
- 12 Varga A. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing // Journal of Virological Methods. – 2005. - № 123. – P.213–220.
- 13 Копина М.Б. Фитофторозные гнили корней малины и земляники, методы их диагностики // Дисс. канд. с.-х. наук. – Москва, 2013. – 129 с.
- 14 Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур. Методические указания. Под ред. В.И. Кашина. – М., ВСТИСП, 2001. – 108с.
- 15 Белошапкина О.О. Система оздоровления земляники садовой от вирусов // Дисс. канд. с.-х. наук. - Москва, 2006. - 370 с.

16 Zh  
simultaneous  
Virology Jour  
17 Du  
TaqMan real-  
18 <http://>  
19 <http://>  
20 [Ge](http://)  
analogs for lai  
4534.

LE

Hazelnut  
appropriately i  
increased in W  
hazelnut indust  
the regions of V  
causing it.

Within t  
Georgia we stu  
hazelnut. In 20  
Western Georgi  
Eastern Georgi  
Georgia - in S  
municipality).

We imp  
protection (on e  
plant). We used  
was made based  
chamber, seedin

The cor  
*Pestalotiopsis*,  
*Alternaria*); am  
occurs in Weste  
show that Pestal

The fung  
leaves the diseas  
spots are often vi  
blackish prod

The fung  
26.49–26.87 × 5  
colorless, and the  
lower last cell a s



16 Zhao Z., Yu Y., Zhang Z. et al A duplex, SYBR Green I-based RT-qPCR assay for the simultaneous detection of Apple chlorotic leaf spot virus and Cherry green ring mottle virus in peach // *Virology Journal*. – 2013, Vol. 10 – P.255.

17 Dubiela C. R. et al Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR // *Tropical Plant Pathology*. - 2013. - Vol. 38, №2. – P.158-165/

18 [http://bib.social/infektsionnyie-bolezni\\_1117/gibridizatsiya-nukleinovyyih-kislot-98598.html](http://bib.social/infektsionnyie-bolezni_1117/gibridizatsiya-nukleinovyyih-kislot-98598.html)

19 <http://www.activestudy.info/gibridizatsiya-nukleinovyx-kislot-metod-dnk-zondov/>.

20 Gebeyehu G., Rao P.Y, Chan P., Simms D.A., Klevan L. Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling and colorimetric detection of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1987 – №11. – P.4513–4514.

## STUDY OF DISEASES OF HAZELTUT IN GEORGIA

**Beruashvili M., Kereselidze M.**

*LEPL Scientific Research Center of Agriculture, Agricultural University of Georgia  
Tbilisi, Georgia, [m.beruashvili@agruni.edu.ge](mailto:m.beruashvili@agruni.edu.ge)*

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) is a very important crop in agriculture of Georgia and rates appropriately in the economy of the country. Therefore in the recent ten years the areas of hazelnut increased in Western Georgia, as well as in Eastern Georgia. However, 2-3 years ago problems arose in hazelnut industry. Together with brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys* Stal.) that spread in the regions of Western Georgia, hazelnut plantations are severely damaged by nut rot and microorganisms causing it.

Within the framework of the project financed by Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia we study the harmful organisms of hazelnut in Georgia and possibilities of producing of bio-pesticides. In 2017-2018 we have conducted the phytosanitary monitoring of hazelnut in Eastern and Western Georgia; with this purpose we periodically registered harmful organisms in hazelnut orchards. In Eastern Georgia the observations were carried out in Kakheti (Kvareli municipality), and in Western Georgia - in Samegrelo (Zugdidi, Chkhorotsku, Abasha municipalities) and in Guria region (Ozurgeti municipality).

We implemented counting of hazelnut harmful organisms by the methods adopted in plant protection (on equal areas chosen on various places of the diagonal of a land plot, from four sides of a plot). We used for monitoring a visual observation, magnifying glass, diagnostics of harmful organisms made based on visual observations, as well as by microscopic analysis in laboratory conditions, moist chamber, seeding on artificial substrate etc.

The conducted researches have resulted in detection of a number of fungal pathogens (*Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gloeosporium*, *Colletotrichum*, *Botrytis*); among them the fungus *Pestalotiopsis* sp. is distinguished by its frequency. This fungus often occurs in Western Georgia, where the climatic conditions are ideal for fungal pathogens. Literary data show that *Pestalotiopsis* sp. on hazelnut is mentioned in many countries, in Europe and Asia; among them we name Turkey (1, 2, 3), Serbia (4), Italy (5) and others.

The fungus *Pestalotiopsis* sp. in Georgia causes damage mainly hazelnut leaves and nuts. On leaves the disease is expressed as big dark brown necrotic spots with the diameter 0.5-1.0 cm; similar lesions are often visible on shoots; nuts rot, a shell also changes color and darkens, from above it is covered with blackish products of pathogen fungi (Pictures 1, 2, 3).

The fungus *Pestalotiopsis* sp. produces conidiospores in big numbers; their sizes attain  $2.87 \times 5.01-8.83$   $\mu\text{m}$ . Spores are typical and consist of 5 cells, from them the first and last are colorless, and the middle three spores are of brown color. On a tip it has three colorless hyphae and on the last cell a short colorless pedicle is derived (Pictures 4, 5).