

УДК 632.3:634.1/7:001.4

UDC 632.3:634.1/7:001.4

**ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ И  
ВИРУСОПОДОБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ  
ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ  
КУЛЬТУР В СВЯЗИ С  
ОСОБЕННОСТЯМИ ПАТОГЕНЕЗА**

**DIAGNOSTICS OF VIRUS AND  
SIMILAR TO A VIRUS ILLNESSES OF  
FRUIT AND BERRY CULTURES IN  
THE CONNECTION WITH FEATURES  
OF PATHOGENY**

Бунцевич Леонид Леонтьевич  
канд. биол. наук

Buntsevich Leonid  
Cand. Biol. Sci.

Костюк Марина Александровна

Kostyuk Marina

Палецкая Екатерина Николаевна

Paletskaya Catherine

*Государственное научное учреждение  
Северо-Кавказский зональный научно-  
исследовательский институт  
садоводства и виноградарства  
Россельхозакадемии,  
Краснодар, Россия*

*State Scientific Organization North  
Caucasian Regional Research Institute of  
Horticulture and Viticulture of the Russian  
Academy of Agricultural Sciences,  
Krasnodar, Russia*

Описаны методы диагностики  
возбудителей вирусных  
и вирусоподобных заболеваний:  
ПЦР-анализ, ИФА, биотестирование  
на древесных индикаторах; метод  
картограмм и биологическая  
актуализованная диагностика.

Methods of diagnostics of activators of virus  
and similar to virus diseases, the PCR  
analysis, ELISA, biotesting with wood  
indicators, a method of cartograms and  
biological actualized diagnostics are  
described.

*Ключевые слова:* ДИАГНОСТИКА,  
ПЦР, ИФА, БИОТЕСТИРОВАНИЕ,  
ИНДИКАТОРЫ, МЕТОД  
КАРТОГРАММ

*Keywords:* DIAGNOSTICS, PCR, ELISA  
TEST, BIOTESTING, INDICATORS,  
METHOD OF CARTOGRAMS.

**Введение.** Место вирусологического фитосанитарного мониторинга в системе оздоровленного питомниководства определяется необходимостью санировать существующие насаждения от вирусов и фитоплазм с целью предотвращения их распространения и перезаражения вновь закладываемых безвирусных маточников и оздоровленных промышленных садов. Устанавливаются основные пути распространения вирусов, которыми могут быть передача с посадочным материалом при прививках (окулировках), перенос насекомыми, нематодами, орудиями труда, пылью, сращиванием корней и т.д. Выделение наиболее важных путей распространения

вирусов и фитоплазм способствует сосредоточению усилий на разработке адекватных мер по локализации этих инфекций.

**Объекты и методы исследований.** Решить поставленную задачу позволяет метод картограмм путём оценки основных характеристик переноса визуально выявляемых вирусов графически, по схеме изучаемого ареала вируса, путём сравнения данных за ряд лет и формализацией переноса как количественного объекта [1]. Предметом изучения служат основные характеристики переноса: скорость и степень распространения, локализация, переносчики.

**Обсуждение результатов.** На первом этапе технологического процесса оздоровления сортов определяется фитосанитарный вирусологический статус насаждений и выделяются визуально здоровые клоны (деревья, кусты, розетки и т.п.) с высоким и качественным урожаем, без симптомов вирусных, фитоплазменных и/или виroidных заболеваний. В маточных насаждениях подвоев визуально отбираются здоровые кусты, отличающиеся высокой продуктивностью, оптимальным вызреванием побегов. Все отобранные растения должны полностью соответствовать сортовым стандартам [2].

Для построения картограммы в рабочий журнал с учётом направления сторон света заносится аналоговая схема насаждения. В условиях современного плодового сада учитываются и фиксируются в журнале, в виде схемы, кварталы, блоки, ряды и места всех деревьев того насаждения, на котором исследуется распространение вируса. Учитывается сортимент, примесь и выпад.

Анализ указанных картограмм включает определение скорости, степени и системных закономерностей распространения вирусов. К последним относятся множественный (заражено несколько деревьев) или единственный (заражены отдельные деревья) характер очагов вирусной инфек-

ции, тенденции к расширению/сокращению ареала, преобладающие направления развития очагов инфекции и др.

Для описания очагов инфекции подсчитывается количество условных вертикальных связей заражённых деревьев на расстоянии не более двух мест между ближайшими заражёнными деревьями и количество условных горизонтальных связей заражённых деревьев на расстоянии не более одного междурядья между ближайшими заражёнными деревьями.

Полученные данные формализуются в виде линейной функции  $F$ , областью определения которой являются значения оси  $x$  (горизонтальный перенос на картограмме), значения оси  $y$  (вертикальный перенос на картограмме). Проводится сравнение полученных данных и результатов их обработки с помощью метода картограмм за ряд лет, анализ наблюдений лёта различных возможных переносчиков, что позволяет дать оценку основных характеристик переноса вирусов, определить фитосанитарную ситуацию в насаждении и, при необходимости, провести санацию. Обследования проводятся в фенофазе полного развития трех-четырёх листьев и в фенофазе съёмной зрелости плодов.

Во время первого обследования выявляют мозаику (ApMV) и пролиферацию (Apple proliferation ph.) яблони, кольцевую мозаику груши (ACLSV); на вишне и черешне – некротическую (NRSV) и хлоротическую кольцевые пятнистости (PDV), желтую мозаику (PLPV), зеленую кольцевую пятнистость (CGRMV), болезни типа gasp leaf, скручивание листьев черешни (SCLRV); на сливе – шарку (PPV), ленточный узор (PLPV), карликовость сливы (PDV); на абрикосе и персике – шарку (PPV), ленточный узор (PLPV), кольцевую пятнистость (PNRSV, PDV). Признаки перечисленных заболеваний проявляются на листьях.

В начале созревания плодов проявляются симптомы вируса шарки (PPV) на плодах абрикоса и персика, желтухи вишни (PDV), некротического пожелтения плодов вишни и черешни, вызванного вирусом ACLSV, а

также X-болезни косточковых культур, зелёной морщинистости плодов яблони (ASPV).

Во время второго обследования (фенофаза съёмной зрелости плодов) выявляются признаки заболеваний типа желтух и все вирусные и вирусоподобные болезни, проявляющиеся в форме поражения плодов: на сливе – шарка (PPV) и псевдошарка (ACLSV); на персике – шарка (PPV), измельчение и деформация плодов, вызванное желтухой и ямчатостью древесины (ASGV); на яблоне – симптомы израстания деревьев, пораженных пролиферацией (Apple proliferation ph.), зеленая морщинистость и звездчатое растрескивание плодов (ASPV), кольцевая пятнистость (ACLV) и мелкоплодность (ACFV); на груше – пожелтение листьев и красная пятнистость листьев (ASPV); болезни отмирания груши, вишни и персика, сопровождаемые ранним пожелтением или покраснением и скручиванием листьев.

Очаги инфекции локализуются. Выделенные визуально здоровые сортообразцы активируются. Сортообразцы, выделенные как исходные для последующего оздоровления, тестируют на скрытое заражение вирусными или вирусоподобными заболеваниями методами ПЦР-диагностики, иммуноферментного анализа (ИФА), с помощью биологического тестирования на травянистых или древесных индикаторах (табл.).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – экспериментальный метод вирусологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК) в тестируемом материале (пробе). В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК (РНК) при помощи ферментов *in vitro*. В результате нарабатываются количества ДНК (РНК), достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который соответствует определённому возбудителю, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце [3-5].

Методы диагностики вирусов, циркулирующих в плодовых  
и ягодных насаждениях Краснодарского края

| №  | Возбудитель                                  | Методы диагностики                                     | №  | Возбудитель                          | Методы диагностики               |
|----|--|--|----|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1  | <i>Plum pox potivirus</i>                    | Biol: GF305<br>ELISA                                   | 13 | <i>Apple proliferation ph.</i>       | Biol: GD                         |
| 2  | <i>Prune dwarf ilarvirus</i>                 | Biol: Shf<br>ELISA                                     | 14 | <i>Rubbery wood, flat limb</i>       | Biol: LL                         |
| 3  | <i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i>    | Biol: Shf<br>ELISA                                     | 15 | <i>Pear decline ph.</i>              | Biol: PV<br>RT-PCR,<br>IC-RT-PCR |
| 4  | <i>Cherry leaf roll nepovirus</i>            | Biol: GF305, B<br>ELISA                                | 16 | <i>Apple chat fruit</i>              | Biol: LL                         |
| 5  | <i>Little cherry closterovirus</i>           | Biol: S, Can<br>PCR                                    | 17 | <i>Apple scar scin viroid</i>        | -                                |
| 6  | <i>Cherry mottle leaf trichovirus</i>        | Biol: S, B<br>PCR                                      | 18 | <i>Apple rosette disease</i>         | Biol: LL                         |
| 7  | <i>European stone fruit yellows ph.</i>      | PCR  | 19 | <i>Strawberry mottle virus</i>       | Biol: UC-4,5,<br>Alp.<br>PCR     |
| 8  | <i>Tomato black ring nepovirus</i>           | Biol: GF305<br>ELISA                                   | 20 | <i>Strawberry green petal ph.</i>    | PCR                              |
| 9  | <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i> | Biol: MP, SR, PV,<br>MR<br>ELISA, RT-PCR,<br>IC-RT-PCR | 21 | <i>Raspberry ring spot nepovirus</i> | ELISA                            |
| 10 | <i>Apple mosaic ilarvirus</i>                | Biol: MP, GD<br>ELISA                                  | 22 | <i>Arabis mosaic nepovirus</i>       | ELISA                            |
| 11 | <i>Apple stem-pitting foveavirus</i>         | Biol: VC, Spy 227,<br>PV<br>RT-PCR,<br>IC-RT-PCR       | 23 | <i>Strawberry vein banding virus</i> | Biol: UC-5,6,12<br>Alp.<br>PCR   |
| 12 | <i>Apple stem-grooving capillovirus</i>      | Biol: VC<br>ELISA                                      | 24 | <i>Strawberry crinkle virus</i>      | Biol: UC-4,5,<br>Alp.<br>PCR     |

Специфичность полимеразной цепной реакции основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами – короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18-30 букв.

Каждый из праймеров сопоставим (комплементарен) с одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.

Подготовка материала к исследованию: для успешного проведения анализа важно правильно собрать материал и правильно провести его подготовку. Известно, что в лабораторной диагностике большинство ошибок (до 70%) совершается именно на этапе пробоподготовки.

Отбор материала производится таким образом, чтобы он не контактировал ни с персоналом, ни с окружающей средой.

В помещении должен быть установлен фильтр биологической очистки со степенью 99,9%. Это связано с тем, что в воздухе постоянно присутствуют фрагменты ДНК (РНК) всевозможных живых организмов, и в процессе подготовки к проведению реакции образец может быть загрязнен — возможно «ложное срабатывание».

Для проведения полимеразной цепной реакции требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК (РНК) вируса, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК-полимераза;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (А, G, С, Т);
- ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например вазелиновое. Добавление специфических ферментов может увеличить выход ПЦР-реакции.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20-35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до  $94-96^{\circ}\text{C}$  (или до  $98^{\circ}\text{C}$ , если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5-2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией – разрушаются водородные связи между двумя цепями. Иногда перед первым циклом проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2-5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на  $4-5^{\circ}\text{C}$  ниже их температуры плавления. Время стадии – 0,5-2 минуты.

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это – стадия элонгации. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы наиболее активны при  $72^{\circ}\text{C}$ . Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 10-15 мин. Для обнаружения (детекции) амплифицированной ДНК (РНК) применяется гель-электрофорез, идентифицирующий продукт ПЦР по длине.

Специфичность метода равна 100%. Высокая специфичность ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК (РНК). Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от метода иммуноферментного анализа, где нередко ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

Методу ПЦР доступно прямое определение наличия возбудителей. Многие традиционные методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

Для ПЦР-диагностики характерна высокая чувствительность. Метод позволяет выявлять даже единичные вирусы. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей вирусных и вирусоподобных заболеваний в тех случаях, когда иммунологическими или микроскопическими методами это сделать невозможно.

Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы.

Существенным преимуществом метода является возможность диагностики вялотекущих и скрытых (латентных) вирусных инфекций. Также для ПЦР-диагностики характерны простота исполнения и возможность полной автоматизации. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, автоматизация процесса амплификации



дают возможность провести полный анализ в течение короткого времени [3, 4, 5].

Установлено, что метод эффективен в определённые периоды развития растений. Большинство вирусов лучше всего поддаётся детекции методом ПЦР-анализа в мае-июне. С наступлением жары вирусные частицы временно инактивируются в растениях и возможны ложные отрицательные тесты.

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** – диагностика, основанная на высокой избирательности и специфичности иммунологических реакций “антиген-антитело”. Различают несколько десятков модификаций ИФА. В диагностике вирусов растений наибольшее распространение получил твердофазный гетерогенный иммунный анализ – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) [6, 7].

Для иммуноферментного анализа используются полистирольные тест-планшеты, на стенках лунок которых заранее адсорбируется антиген. Исследуемый образец вносится в лунку планшета. При этом гомологичные антигену антитела прикрепляются к нему. Не прикрепившиеся антитела удаляются промыванием. Далее в лунки вносят антитела против тестируемых иммуноглобулинов (антител), меченые ферментом. Если в исследуемом образце присутствовали определяемые антитела, то они на этом этапе выступают в роли антигенов, с которыми прореагируют меченые антитела. Добавление после промывки хромогенного вещества (красителя) позволяет учесть реакцию по развивающемуся окрашиванию в ячейках. Интенсивность окраски при этом пропорциональна количеству фермента и, следовательно, количеству антител.

Результат оценивается спектрофотометрически или визуально. При измерении оптической плотности (ОП) жидкости в лунке и сравнении ее с контрольным образцом подсчитывается концентрация антител в едини-

цах объема. Наиболее часто применяется подсчет результатов в единицах оптической плотности.

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на лизатные, в которых используется смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре); рекомбинантные – в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определенных белковых антигенов возбудителя; пептидные – использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностикумов – это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным [7].

За счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа – удобства в работе, быстроты, объективности за счет автоматизации учёта результатов – в настоящее время он является одним из основных методов тестирования вирусных и вирусоподобных заболеваний плодовых культур (см. табл.).

Установлено, что в условиях юга России диагностику вирусных болезней плодовых и ягодных культур методом ИФА следует проводить весной и в начале лета, когда в растении накапливается максимальное количество вирусных частиц. Позже вирусы инактивируются под воздействием высоких температур, что может послужить причиной ложных отрицательных тестов.

**Биологическое тестирование** выполняется на древесных и травянистых индикаторах. Тестирование на древесных индикаторах заключается в заражении способом множественной окулировки (5-6 глазков или щитков тестируемого растения) индикаторных растений. Биологическое тестиро-

вание земляники садовой проводится способом микропрививки черешков листьев индикаторного растения клинообразно заточенными черешками листьев тестируемых образцов [1]. И древесные и травянистые индикаторные растения выращиваются предварительно, культивируются в контейнерах с закрытой корневой системой в условиях строгой изоляции. Период ожидания у травянистых индикаторов – 30-60 дней, у древесных индикаторов – 45 дней-3 года.

Для повышения надёжности и эффективности диагностики на основе тестирования с помощью древесных индикаторов разработана “Биологическая актуализованная диагностика”. Принцип методики состоит во внедрении (способом окулировки или прививки) и постоянном присутствии биологических индикаторов наиболее опасных заболеваний в организмах тестируемых растений. При проникновении вирусной или фитоплазменной инфекции в растение индикатор сигнализирует об инвазии, даже если течение болезни проходит латентно.

Для подготовки теста в летний период вызревшие черенки древесных индикаторов заготавливаются с тестируемых безвирусных маточных растений. Сортимент биологических индикаторов приведён в рекомендациях по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда [2].

По морфометрическим и фитосанитарным показателям заготовленные черенки должны соответствовать действующим нормативам [8]. Черенки дефолируются и хранятся пучками в холодильнике при температуре 4-10<sup>0</sup>С, тщательно упакованные в воздухонепроницаемые полиэтиленовые пакеты. Используются черенки по мере необходимости.

Основным способом проведения биологизированной актуализованной диагностики вирусов и фитоплазм в плодовых растениях является окулировка биологических индикаторов в крону тестируемых растений. Для этого в окулировочный период (в условиях юга России: июль-август)

на однолетние вызревшие приросты тестируемых деревьев прививаются методом “вприклад” глазки (окулюсы) растений-индикаторов (на уровне груди окулировщика). Секатор и нож стерилизуются этиловым спиртом после каждой операции с целью предотвращения переноса вирусов или других патогенов. Привитый глазок обвязывается лентой из полиэтиленовой плёнки, место прививки этикетуруется. После срастания прививочных компонентов и до наступления холодов плёнка срезается. Окулировка выполняется в трёхкратной повторности.

Дополнительным способом проведения биологизированной актуализированной диагностики вирусов и фитоплазм в плодовых растениях является позднезимняя или ранневесенняя прививка биологических индикаторов в крону тестируемых растений. Для этого после завершения основных зимних холодов и до начала сокодвижения (февраль) на однолетние вызревшие приросты тестируемых деревьев прививаются методом улучшенной копулировки черенки растений-индикаторов. Техника исполнения, как описано выше.

В наступившем после окулировки или зимней (ранневесенней) прививки вегетационном сезоне проводится учёт приживаемости. Отмирание прививочных компонентов (глазков или черенков индикаторов) может быть вызвано вирусной или иной инфекцией, несовместимостью компонентов, низким качеством прививочных операций, внешними факторами (сильные морозы и т.п.). В любом случае при отмирании прививок индикаторов операция повторяется в следующем сезоне.

Деревья, показавшие неоднократные отмирания индикаторов, исключаются из диагностирования представленным методом. Прижившиеся глазки или черенки индикаторов в вегетационный период после прививки отрастают в побеги-индикаторы. С первого сезона и в течение ряда лет по состоянию побегов-индикаторов констатируется фитосанитарный статус тестируемых растений.

Результат диагностики считается положительным, если на индикаторных побегах были выявлены специфические симптомы [9].

*У яблони привитыми индикаторами диагностируются:*

- | <i>индикатор</i> | <i>диагностируемые заболевания</i>  |
|------------------|---|
| L. LAMBOURNE     | – диагностирует мозаику яблони, гуттаперчивость древесины яблони, мелкоплодность, розеточность;                                     |
| GRAVENSTAIN      | – уплощение ветвей;   |
| M. PLATICARPA    | – хлоротическую пятнистость листьев, шелушение коры платикарпы, пролиферацию, бурую кольцевую пятнистость плодов;                   |
| V. CRAB          | – ямчатость древесины (отмирание Спай), борозчатость древесины, пролиферацию, звездчатое растрескивание плодов, пятнистость плодов; |
| M. BACCATA       | – вирусную паршу плодов, грубую кожицу плодов;  |
| SPY              | – ямчатость древесины (отмирание Спай), хлоротическую пятнистость листьев.  |

*У груши и айвы привитыми индикаторами диагностируются:*

- |                     |  |
|---------------------|--|
| BEURRE HARDY        | – диагностирует хлоротическую пятнистость листьев (кольцевую мозаику), пожелтение жилок; |
| P. AROMATICA        | – отмирание груши;   |
| PYRONIA<br>VEITCHII | – пожелтение жилок и красную пятнистость; каменистость плодов;                           |
| C 7/1               | – хлоротическую пятнистость листьев.   |

*У вишни и черешни привитыми индикаторами диагностируются:*

- |      |   |
|------|---|
| BING | – диагностирует кольцевую пятнистость малины, арабис – мозаику, некротическую и хлоротическую пятнистость, скручивание листьев, крапчатость листьев черешни, венгерскую серполистность, черный рак черешни; |
| SAM  | – мелкоплодность черешни;   |

- СЕЯНЦЫ  
PRUNUS AVIUM – скручивание листьев, европейскую ржавую крапчатость черешни, кольцевую крапчатость черешни;
- KWANZAN – зеленую кольцевую крапчатость и подавление роста декоративной черешни;
- SHYROFUGEN – некротическую и хлоротическую кольцевые пятнистости косточковых.

*У сливы, алычи, абрикоса, персика привитыми индикаторами диагностируются:*

- СЕЯНЦЫ  
ELBERTA, ГФ-305 – диагностирует мозаику персика, ленточный узор сливы, шарку, желтую пятнистость листьев персика, желтуху персика, розеточность, ямчатость ствола, X-болезнь персика, мелкоплодность персика, бородавчатость плодов персика, ленточный узор сливы, ХПЛЯ, ситцевый узор абрикосов;
- CAMBRIDGE GAGE – растрескивание коры сливы, шарку, охряную мозаику сливы, узкую полосатую мозаику сливы;
- MOORPASK – узкую полосатую мозаику сливы, шарку;
- ВЕНГЕРКА ИТАЛ. – шарку, скручивание листьев сливы.

Растения, на которых привитые индикаторы не показывают на момент ревизии симптомов вирусов и фитоплазм, то есть получен отрицательный тест, считаются безвирусными.

Масштабное применение биологической актуализованной диагностики в технологической цепочке производства оздоровленного посадочного материала позволяет значительно сократить расходы на тестирование исходных растений за счёт частичного отказа от дорогостоящих молекулярных и иммунологических методов. Системное применение диагностики

повышает надёжность анализа по причине постоянного присутствия индикатора в тестируемом растении и сплошного (а не выборочного) характера представления исследуемого материала.

Установлено, что визуализация симптомов вирусных заболеваний растений при биологическом тестировании и фитосанитарных обследованиях насаждений отличается длительным периодом эффективного выявления признаков заражения.

Симптомы вирусных заболеваний, проявившиеся в весенне-раннелетний период, зачастую сохраняются до поздней осени, практически до листопада. Разумеется, характер и степень их проявления меняются: симптомы, яркие в мае и июне, с наступлением жары тускнеют, на молодых листьях могут не появиться вовсе, меняется рисунок (например, кольцевая пятнистость может смениться полосами и прижилковыми хлорозами), лист из ровного становится морщинистым и хрупким и пр.

**Выводы.** В ходе исследований по совершенствованию методики производства оздоровленного посадочного материала выявлены некоторые особенности патогенеза вирусных и вирусоподобных болезней плодовых и ягодных культур в условиях юга России и связанные с ними особенности диагностирования.

Установлено, что методы ПЦР-диагностики, иммуноферментного анализа (ИФА) обладают высокой чувствительностью, удобством в работе, быстротой, и объективностью, однако они эффективны только в определённые периоды развития растений. Большинство вирусов лучше всего поддаётся детекции методом ПЦР-анализа или ИФА в мае-июне. С наступлением жаркого времени года вирусы временно инактивируются в растении и возможны ложные отрицательные тесты.

Биологическое тестирование и визуализация симптомов в ходе вирусологических фитосанитарных обследований, напротив, обладают широким временным спектром, хотя и не позволяют во многих случаях прово-

дить высокоточную дифференцированную идентификацию возбудителей. Биологическое тестирование на древесных индикаторах обладает высокой чувствительностью.

Наиболее точная диагностика возбудителей в определённых растительных объектах (например, исходных или оздоровленных маточных растениях) возможна при комплексном использовании ПЦР-анализа или ИФА и тестирования на древесных индикаторах. Визуализация проявляющихся внешне инфекций повышает эффективность обнаружения и диагностики вирусов и других возбудителей.

Использование метода картограмм и биологической актуализованной диагностики повышает эффективность методик фитосанитарного вирусологического мониторинга и контрольного тестирования на вирусоносительство оздоровленных маточных растений.

### Литература

1. Бунцевич, Л.Л. Метод картограмм в описании переноса визуально выявляемых вирусов / Бунцевич Л.Л., Костюк М.А., Данилюк Ю.П. // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2010. – № 6. – Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/10/05/12.pdf>.
2. Рекомендации по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда.– М.: Колос.– 1980.– 37 с.
3. ПЦР 2002,– <http://molbiol.ru>
4. Вартапетян, А.Б. Полимеразная цепная реакция / А.Б. Вартапетян // Молекулярная биология. – М.: Наука, 1991. –Т. 25. – вып. 4.– С. 926-933.
5. Real-Time PCR- 2002., <http://www.lytech.ru/Inform/pcrmethod.htm>
6. Clark, M.F. Characterization of the microplate of enzyme — linked immunosorbent assay for detection of plant viruses / M.F. Clark, A.N. Adams // J.Gen.Virol. 1977. – Vol. 34. – P. 475-483.
7. Fidan, U. Indexing of apple trees for apple mosaic virus, apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by ELISA / U. Fidan // J. Tur. Phytopathol, 1994. Vol. 23.– № 3. – P.127-132.
8. ГОСТ Р 53135 – 2008/ Посадочный материал плодовых, ягодных, субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая// Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2009.– 41 с.
9. Вердеревская, Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда/ Т.Д. Вердеревская, В.Г.Маринеску.– Кишинев: Штиинца, 1985.– 311 с.