

Раздел 4.
МЕТОДИКИ, РЕКОМЕНДАЦИИ, ТЕХНОЛОГИИ,
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕГЛАМЕНТЫ

УДК 634:632.38

**МЕТОДИКА ДИАГНОСТИКИ ОСНОВНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР***

**Н.В. Кухарчик, Е.В. Колбанова, Н.Н. Волосевич, М.С. Кастрицкая,
Т.Н. Божидай, С.Э. Семенас**

РУП «Институт плодоводства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: Kychnataly@rambler.ru

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Методика лабораторных методов (ИФА, ПЦР-анализ), позволяющая выявлять симптоматические и латентные формы заболеваний, разработана с целью разрешения задач по увеличению объемов производства оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных сельскохозяйственных растений, достоверной диагностики патогенов, мониторинга вирусных инфекций.

Настоящая методика обязательна для определения фитосанитарного состояния насаждений и посадочного материала плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*, маточных насаждениях, полях размножения питомников, как отечественного производства, так и саженцев, завезенных в Республику Беларусь.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Помещение для мытья посуды; комната для предварительной обработки растительного материала; автоклавная комната; комнаты (2) для проведения этапов ПЦР и ИФА; комната для документирования и обработки данных.

При выполнении работ необходимо соблюдать чистоту, все помещения должны периодически обрабатываться антисептиками и дополнительно облучаться бактерицидными лампами. Всю стеклянную посуду тщательно моют хлорсодержащими агентами, сушат и стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 2,5 часов.

При работе с автоклавом, ультрафиолетовыми облучателями и стерилизующими агентами необходимо соблюдение дополнительных мер безопасности, прописанных в инструкциях.

3. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Оборудование и материалы для предварительной обработки растений: дистиллятор; бидистиллятор; pH-метр; мойки; сухожаровой шкаф, автоклав (для стерилизации пластика и воды), автоклав (для стерилизации и утилизации отработанного материала), печи микроволновые; весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 2000 г; наборы стерилизующих агентов; набор химических соединений; посуда лабораторная; набор автоматических пипеток переменного объема; наконечники одноразовые 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл; гомогенизатор.

* Рекомендована к публикации Ученым советом РУП «Институт плодоводства», протокол № 12 от 10.11.2014.

Оборудование и материалы для ИФА: термостат (от 36 °С до 70 °С); устройство для промывки микропланшет (вошер) PW 40; фотометр для микропланшетов iMark (Bio-Rad, США) или автоматический ридер PR 2100 ("Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc.", Франция); центрифуга со скоростью вращения ротора до 13000 об/мин; холодильник бытовой с отделениями 2-8 °С и -18...-20 °С; пробирки полипропиленовые объемом 1,5-2,0 мл; набор автоматических пипеток переменного объема; наконечники одноразовые 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл; стеклянная химическая посуда; микропланшеты, одноразовые резиновые перчатки.

Оборудование и материалы для ПЦР: термостат (от 36 °С до 70 °С); амплификатор iCycler (BioRad, США); камера для горизонтального гель-электрофореза с источником питания; система гель-документирования (трансиллюминатор Gel Doc (BioRad, США); центрифуга со скоростью вращения ротора до 13000 об/мин; микроцентрифуга/вортекс; холодильник бытовой с отделениями 2-8 °С и -18...-20 °С; пробирки полипропиленовые объемом 0,2 и 1,5 мл; набор автоматических пипеток переменного объема; наконечники одноразовые 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл; одноразовые резиновые перчатки; микроволновая печь для плавления агарозы; штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5 мл; весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 2000 г, 600 г; стеклянная химическая посуда; пинцеты медицинские; скальпели хирургические.

Реактивы для ИФА:

- наборы диагностических реагентов на вирусы, содержащие
 - вирусоспецифические антитела (иммуноглобулины) и конъюгирующие антитела;
 - положительный и отрицательный контроли;
 - буферы для ИФА:
 - экстрагирующий буфер (PBS-TPO) (состав буфера (pH 7,3) – NaCl – 8,0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ – 2,9 г, KH_2PO_4 – 0,2 г, KCl – 0,2 г, твин-20 – 0,5 мл, PVP-40 – 20 г, бычий сывороточный альбумин – 5 г (или овальбумин – 2 г), H_2O – до 1 л);
 - конъюгирующий (состав буфера (pH 7,4) – NaCl – 8,0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ – 2,9 г, KH_2PO_4 – 0,2 г, KCl – 0,2 г, твин-20 – 0,5 мл, бычий сывороточный альбумин – 5 г (или овальбумин – 2 г), H_2O – до 1 л);
 - субстратный буфер (состав буфера (pH 9,8) – 97 мл диэтаноламина на 1 л H_2O , с помощью HCl довести pH в течение 3 суток до 9,8);
 - промывающий буфер (состав буфера (pH 7,4) – NaCl – 8,0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ – 2,9 г, KH_2PO_4 – 0,2 г, KCl – 0,2 г, твин-20 – 0,5 мл, H_2O – до 1 л);
 - субстратные таблетки (pNPP) или 4-нитрофенилфосфат натрия.

Реактивы для IC-RT-PCR:

- вирусоспецифические антитела (IgG);
- буферы PBS-T, PBS-TPO, покровный:
 - PBS-T** (промывающий буфер) (состав буфера (pH 7,4) – NaCl – 8,0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ – 2,9 г, KH_2PO_4 – 0,2 г, KCl – 0,2 г, твин-20 – 0,5 мл, H_2O – до 1 л);
 - PBS-TPO** (экстрагирующий буфер) (состав буфера (pH 7,3) – NaCl – 8,0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ – 2,9 г, KH_2PO_4 – 0,2 г, KCl – 0,2 г, твин-20 – 0,5 мл, PVP-40 – 20 г, бычий сывороточный альбумин – 5 г (или овальбумин – 2 г), H_2O – до 1 л);
 - покровный буфер** (состав буфера (pH 9,6) – Na_2CO_3 – 1,59 г, NaHCO_3 – 2,93 г, H_2O – до 1 л); 0,01 М Tris/Cl буфер (pH 8,0);
 - набор Titan One Step RT-PCR (Roche) или другого производителя, предназначенный для проведения RT-PCR анализа в одной реакции;

- праймеры;
- реагенты для гель-электрофореза: этидиум бромид, агароза, 10×ТАЕ-буфер, маркер молекулярных масс, 6×загрузочный буфер.

4. ПЕРЕЧЕНЬ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР, ВКЛЮЧЕННЫХ В СЕРТИФИКАЦИОННУЮ ПРОГРАММУ

1. *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)*, 2. *Apple mosaic virus (ApMV)*, 3. *Apple stem grooving virus (ASGV)*, 4. *Arabid mosaic virus (ArMV)*, 5. *Blueberry shoestring virus (BSSV)*, 6. *Black currant reversion virus (BCRV)*, 7. *Cherry leaf roll virus-ch (CLRV)*, 8. *Cucumber mosaic virus, CMV*, 9. *Grapevine fanleaf virus (Nepovirus, GFLV)*, 10. *Grapevine leafroll-associated virus 1 (Ampelovirus, GLRaV 1)*, 11. *Grapevine leafroll-associated virus 2 (Closterovirus, GLRaV 2)*, 12. *Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus, GLRaV 3)*, 13. *Grapevine virus A (Vitivirus, GVA)*, 14. *Grapevine fleck virus (Maculovirus, GFkV)*, 15. *Plum pox virus (Sharka, PPV)*, 16. *Prune dwarf virus (PDV)*, 17. *Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)*, 18. *Raspberry ringspot virus-ch (RRV)*, 19. *Raspberry bush dwarf virus (RBDV)*, 20. *Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)*, 21. *Tomato black ring virus (TBRV)*, 22. *Tomato ringspot virus (TomRSV)*, 23. *Tobacco ring spot nepovirus (TRSV)*, 24. *Peach rosette mosaic nepovirus (PRMV)*, 25. *Blueberry scorch carlavirus (BlScV)*, 26. *Blueberry shock ilarvirus, BlShV (BSIV)*.

5. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ФИТОСАНИТАРНЫХ ОБСЛЕДОВАНИЙ И ОТБОРА ПРОБ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Визуальную диагностику вирусов проводят в насаждениях в период активной вегетации в конце весны – начале лета. Наличие симптомов оценивают на листьях, плодах, побегах [1]. В небольших насаждениях (до 1 га) и приусадебных участках осматривают каждое растение, в насаждениях от 1 га до 3 га – 20 % растений, в насаждениях более 3 га – 10 % растений. В многосортных насаждениях осматривают все сорта отдельно. Обследование не проводят в условиях экстремально жаркой погоды, а также в течение двух недель после длительного периода температур выше +25 °С. Оптимальные сроки ИФА тестирования вирусов – май – начало июля.

Для проведения иммуноферментного анализа отбирают листья в первую очередь с визуальными симптомами, поврежденные вредителями, морфологически аномальные. При отсутствии симптомов листья отбирают с разных сторон кроны со средней части побегов.

Для плодовых и ягодных культур тестирование в соответствии со стандартами Республики Беларусь [2-6] (при их отсутствии используются нормативы ЕРРО) проводится на следующие вирусы:

Яблоня:

1. **Вирус мозаики яблони** (*Apple mosaic ilarvirus, ApMV*).
2. **Вирус бороздчатости древесины яблони** (*Apple stem-grooving virus, ASGV*).
3. **Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони** (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus, ACLSV*).

Груша:

1. **Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони** (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus, ACLSV*).

Вишня, черешня:

1. Вирус карликовости сливы (*Prune dwarf ilarvirus*, PDV).
2. Вирус некротической кольцевой пятнистости сливы (*Prunus necrotic ringspot ilarvirus*, PNRSV).
3. Вирус скручивания листьев черешни (*Cherry leaf roll nepovirus*, CLRV).
4. Вирус Шарки сливы (*Plum pox potyvirus*, PPV).
5. Вирус мозаики яблони (*Apple mosaic ilarvirus*, ApMV).
6. Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus*, ACLSV).
7. Вирус кольцевой пятнистости малины (*Raspberry ringspot nepovirus*, RpRSV, RRSV).

Слива, алыча:

1. Вирус карликовости сливы (*Prune dwarf ilarvirus*, PDV).
2. Вирус некротической кольцевой пятнистости сливы (*Prunus necrotic ringspot ilarvirus*, PNRSV).
3. Вирус Шарки сливы (*Plum pox potyvirus*, PPV).
4. Вирус мозаики яблони (*Apple mosaic ilarvirus*, ApMV).
5. Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (*Apple chlorotic leaf spot trichovirus*, ACLSV).

Смородина черная, красная, крыжовник:

1. Вирус мозаики арабис (резухи) (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV, синоним – *Raspberry yellow dwarf virus*, ArMV-H (для хмеля)).
2. Вирус реверсии чёрной смородины (*Blackcurrant reversion virus*, BCRV).
3. Вирус огуречной мозаики (*Cucumber mosaic virus*, CMV).
4. Вирус кольцевой пятнистости малины (*Raspberry ringspot nepovirus*, RpRSV, RRSV, синоним – *Raspberry Scottish leaf curl virus*).
5. Вирус чёрной кольчатости томата (*Tomato black ring nepovirus*, TBRV).
6. Вирус кольцевой пятнистости томатов (*Tomato ringspot nepovirus* TomRSV).
7. Вирус латентной кольцевой пятнистости земляники (*Strawberry latent ringspot nepovirus*, SLRV).

Малина летняя, малина ремонтантная, ежевика:

1. Вирус мозаики арабис (резухи) (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV).
2. Вирус мозаики яблони (*Apple mosaic ilarvirus*, ApMV).
3. Вирус кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV).
4. Вирус кольцевой пятнистости малины (*Raspberry ringspot nepovirus*, RpRSV, RRSV, синоним – *Raspberry Scottish leaf curl virus*).
5. Вирус чёрной кольчатости томата (*Tomato black ring nepovirus*, TBRV).
6. Вирус кольцевой пятнистости томатов (*Tomato ringspot nepovirus* TomRSV).
7. Вирус латентной кольцевой пятнистости земляники (*Strawberry latent ringspot nepovirus*, SLRV).

Земляника садовая:

1. Вирус мозаики арабис (резухи) (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV).
2. Вирус кольцевой пятнистости малины (*Raspberry ringspot nepovirus*, RpRSV, RRSV, синоним – *Raspberry Scottish leaf curl virus*).
3. Вирус чёрной кольчатости томата (*Tomato black ring nepovirus*, TBRV).
4. Вирус кольцевой пятнистости томатов (*Tomato ringspot nepovirus* TomRSV).
5. Вирус латентной кольцевой пятнистости земляники (*Strawberry latent ringspot nepovirus*, SLRV).

Виноград:

A. Grapevine degeneration complex

1. **Вирус мозаики арабис** (*Arabis mosaic virus, Nepovirus, ArMV*).
2. **Вирус короткоузлиия винограда** (*Grapevine fanleaf virus, Nepovirus, GFLV*).
3. **Вирус кольцевой пятнистости малины** (*Raspberry ringspot virus, Nepovirus, RpRSV*).
4. **Вирус латентной кольцевой пятнистости земляники** (*Strawberry latent ringspot virus, Sadwavirus, SLRV*).
5. **Вирус чёрной кольчатости томата** (*Tomato black ring virus, Nepovirus, TBRV*).

B. Grapevine leafroll complex

6. **Скручивание листьев винограда-1** (*Grapevine leafroll-associated virus 1, Ampelovirus, GLRaV 1*).
7. **Скручивание листьев винограда-2** (*Grapevine leafroll-associated virus 2, Closterovirus, GLRaV 2*).
8. **Скручивание листьев винограда-3** (*Grapevine leafroll-associated virus 3, Ampelovirus, GLRaV 3*).

C. Grapevine rugose wood complex

9. **Вирус А винограда** (*Grapevine virus A, Vitivirus, GVA*).

D. Grapevine fleck disease

10. **Вирус пятнистости винограда** (*Grapevine fleck virus, Maculovirus, GFkV*).

Брусника, голубика, клюква:

1. **Вирус нитчатости голубики** (*Blueberry shoestring sobemovirus, BSSV*).
2. **Вирус кольцевой пятнистости томатов** (*Tomato ringspot nepovirus TomRSV*).
3. **Вирус кольцевой пятнистости табака** (*Tobacco ring spot nepovirus, TRSV*).
4. **Вирус розеточной мозаики персика** (*Peach rosette mosaic nepovirus, PRMV*).
5. **Вирус ожога голубики** (*Blueberry scorch carlavirus, BlScV*).
6. **Вирус шока голубики** (*Blueberry shock ilarvirus, BlShV (BSIV)*).

6. ПОРЯДОК ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ И ПОДТВЕРЖДЕНИИ СТАТУСА ССЭ БАЗОВЫХ РАСТЕНИЙ В ИМЕЮЩИХСЯ НАСАЖДЕНИЯХ

Для выделения ССЭ базовых растений в маточно-черенковых насаждениях сортов плодовых культур, винограда, форм клоновых подвоев плодовых культур осматривают и отбирают образцы с каждого растения индивидуально.

Для подтверждения статуса ССЭ базовых растений в маточно-черенковых насаждениях сортов плодовых культур, винограда, форм клоновых подвоев плодовых культур осматривают и отбирают образцы с каждого растения индивидуально.

Для подтверждения статуса ССЭ базовых растений в маточно-черенковых насаждениях сортов ягодных культур (смородина черная, красная, белая, крыжовник) осматривают и отбирают образцы с каждого сорта растений (отбирают наименее здоровые):

- до 20 шт. – 50 %,
- от 21 до 100 шт. – 10 %,
- более 100 шт. – 2,5 %.

Для подтверждения статуса ССЭ базовых растений в отводковых маточниках клоновых подвоев плодовых культур, сортов малины, сортов крыжовника осматривают и отбирают образцы с каждой формы или сорта (отбирают наименее здоровые):

- до 0,1 га – 5,0 %,
- свыше 0,1 до 1,0 га – 1,5 %,
- свыше 1,0 га – 0,5 %.

7. ПОРЯДОК ВЫДЕЛЕНИЯ ССЭ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ЗАКЛАДКИ БАЗОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ

Для выделения ССЭ базовых растений сортов плодовых культур, винограда, выращиваемых в открытом грунте, осматривают и отбирают образцы с каждого растения индивидуально.

Для выделения ССЭ базовых растений сортов плодовых, ягодных культур и винограда из растений, введенных в культуру *in vitro* из маточных растений класса Б и В, тестируют клоны культуры *in vitro* (3 растения с каждого клона), при отсутствии учета клонов отбирают образцы с каждого растения индивидуально.

Для выделения ССЭ базовых растений сортов плодовых, ягодных культур и винограда из растений, полученных в культуре *in vitro* из маточных растений класса А, тестирование не проводят.

При покупке ССЭ растений плодовых, ягодных культур и винограда за пределами Беларуси тестирование проводят на вирусные патогены, не диагностируемые в стране приобретения, на указанные в документах вирусы, выборочное тестирование материала проводится по желанию покупателя.

8. ПОРЯДОК ОТБОРА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Образцы для анализа отбирают в присутствии представителя организации, где проводится проверка насаждений, и представителя контролирующей организации.

Отбирают образцы растений (цветы, стебли, листья, плоды) с наиболее свежими и выраженными симптомами, но не полностью погибшие.

Каждый образец помещают в отдельный пакет с указанием названия организации, сада, квартала, ряда и места дерева.

Растение, с которого взят образец, этикируется так, чтобы в дальнейшем возможна была индивидуальная идентификация растения.

Образцы помещают в индивидуальные пластиковые пакеты и хранят не более 7 дней при температуре +4 °С.

Объем образца – не менее 15 г, 6-8 листьев.

9. ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ ЛАБОРАТОРНЫМИ МЕТОДАМИ

Общие положения. Диагностику вирусов проводят методами иммуноферментного анализа (TAS-ELISA, DAS-ELISA), в соответствии с методическими указаниями фирмы производителя антител (наборов для диагностики). ПЦР-анализ с обратной транскрипцией и иммобилизацией вирусных частиц с помощью вирусоспецифических антител (IC-RT-PCR) проводят в соответствии с рекомендациями фирмы производителя реагентов для One Step RT-PCR.

Для спорных случаев используют комбинацию серологических (ELISA) и молекулярно-биологических (PCR) методов.

Обязательно включение в тесты положительного и отрицательного контролей.

9.1. Протокол иммуноферментной диагностики вирусов

1. Специфические антитела разводят в покровном буфере, вносят их в лунки микроплант, которые затем инкубируют. Разведение антител, вносимое количество в лунки микроплант, температуру и время инкубации выдерживают в соответствии с инструкцией производителя. После этого проводят промывку промывающим буфером при помощи вошера PW 40 (или аналога) 3-5 раз в соответствии с предложенными рекомендациями.

2. Для анализа взвешивают 0,3 г растительного материала.
3. Проводят гомогенизацию растительного материала в индивидуальном пластиковом пакете с добавлением экстрагирующего буфера в соотношении 1:10 – 1:20.
4. В лунки микроплат вносят экстракт каждого тестируемого образца в двукратной повторности и оставляют на ночь при температуре +4 °С. На следующий день осуществляют промывку с помощью вошера.
5. Разведенные в конъюгирующем буфере конъюгирующие антитела вносят в лунки микроплат и инкубируют, затем промывают. Разведение антител, вносимое количество в лунки микроплат, температуру и время инкубации выдерживают в соответствии с инструкцией производителя.
6. Разведенные в конъюгатном буфере антивидовые конъюгирующие антитела с алкоинозой фосфатазой (в соответствии с инструкцией производителя) вносят по 100 мкл в лунки микроплат. После инкубирования, которое проводят при температуре +37 °С в течение 2 часов, осуществляют трехкратную промывку.
7. Р-нитрофенилфосфат, растворенный в субстратном буфере, вносят в лунки микроплат и инкубируют при +37 °С или комнатной температуре в темноте (в соответствии с рекомендациями).
8. Считывание и регистрацию результатов проводят через 30, 60 и 120 минут после инкубирования на автоматическом ридере при длине волны 405 нм (A_{405}). Сравнивают показатели оптической плотности анализируемых образцов (A_0) с показателями оптической плотности отрицательного контроля (A_k). Образцы, значение оптической плотности у которых превышает на 100 % и более среднюю оптическую плотность отрицательного контроля ($A_0 \geq A_k + 100\%$), считают положительными. Десятикратное превышение положительного контроля над отрицательным контролем дает основание судить о достоверности результатов тестирования. Для каждой отдельной микроплаты используют свой положительный и отрицательный контроль.

Повторность анализа каждого образца двукратная.

Документами, подтверждающими проведение ИФА тестирования, являются:

- акт отбора образцов с указанием организации, даты отбора, квартала, ряда, места тестируемых растений;
- порядок внесения образцов в лунки плашки;
- справка с указанием полученных результатов распечатки ридера (оптическая плотность образцов) с указанием тестируемого вируса, даты проведения анализа.

9.2. Протокол проведения IC-RT-PCR-анализа

1. В ПЦР пробирки объемом 200 мкл вносят раствор антител (растворенных в покровном буфере) по 110 мкл и инкубируют при +37 °С в течение 4 часов. Пробирки трижды промывают 140 мкл PBS-Т буфером.
2. В пробирки помещают растительные экстракты (разведение 1:10 – 1:20 в PBS-ТРО буфере, по 100 мкл экстракта на пробирку) и инкубируют в течение ночи при температуре +4 °С.
3. После инкубирования пробирки промывают четыре раза с использованием PBS-Т (по 140 мкл) и один раз 0,01 М Tris/Cl (по 170 мкл) pH 8,0, с последующим центрифугированием (10000 об/мин., 1 мин.) и тщательным удалением остатков промывочных буферов.
4. После центрифугирования пробирки держат на льду и при +4 °С до добавления реакционной смеси, после чего их сразу перемещают в амплификатор (BIO-Rad, США). Для реакций используют набор Titan One Step RT-PCR (Roche) или другого производителя.

5. Продукты амплификации разделяют при помощи электрофореза в 1,6%-ном агарозном геле.

6. Рекомендуемые праймеры, условия проведения и размер предполагаемого продукта амплификации приведены в таблице.

7. Документами, подтверждающими проведение ПЦР тестирования, являются:

- акт отбора образцов с указанием организации, даты отбора, квартала, ряда, места тестируемых растений;
- фотография геля с указанием дорожек положительного, отрицательного контролей и образцов.

Таблица – Праймеры и условия для определения вирусов Шарки, кустистой карликовости малины, мозаики яблони и реверсии смородины черной методом IC-RT-PCR

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига	Размер ПЦР продукта	Источник
Plum pox virus, PPV				
PPV-P1	ACCGAGACCACTACACTCCC	50°C	243 пн	[9]
PPV-P2	CAGACTACAGCCTCGCCAGA			
Raspberry bushy dwarf virus, RBDV				
CP-R	CCCACTAGCAGGCAAATAGTC	50°C	886 пн	[6]
CP-F	TCATTGTTGAATTAATACTAAGTATTTAAG			
Apple mosaic virus, ApMV				
ApMVup1061	TAGTCGCGAGCGTTTTATTTTCAT	50°C	784 пн	Разработка авторов
ApMVd1845	CTTCGAGCTTCACAGTCCT			
ApMVup	ATGACAACACTGGGAGATAAAC	50°C	860 пн	[7]
ApMVd	TCATCCGCTTATATTTCCAATG			
Blackcurrant reversion virus, BCRV				
BRAV5	AAACCAGACCCAGGTGAGTG	50°C	468 нп	[8]
BRAV6	GGACACTTCCATATAAGTCGGC			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика содержит перечень вирусов, описание способов отбора образцов для тестирования зараженности растений, перечень и последовательность лабораторных методов тестирования. Диагностика осуществляется с использованием методов иммуноферментного анализа и ПЦР-анализа. Методика предназначена к применению для профильных лабораторий (селекционных, иммунологических, биотехнологических), использующих ИФА и ПЦР-анализы для диагностики зараженности вирусными патогенами плодовых и ягодных культур.

Количество тестируемых патогенов – 26 вирусных патогенов.

Количество методов оценки – 2: ИФА (DAS-ELISA) – 26 вирусов, ПЦР (IC-RT-PCR) – 4 вируса.

Тестируемые культуры: яблоня, груша, слива, алыча, вишня, черешня, смородина черная, смородина красная, крыжовник, малина летняя, малина ремонтантная, ежевика, земляника садовая, виноград, брусника, голубика, клюква.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кухарчик, Н.В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н.В. Кухарчик. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 209 с.
2. Саженьцы семечковых, косточковых культур и ореха грецкого. Технические условия: СТБ 1602-2006. – Введен 2006-05-01. – Минск: Госстандарт, 2006. – 12 с.
3. Подвои плодовых культур и ореха грецкого. Технические условия: СТБ 1603-2006. – Введен 2006-05-01. – Минск: Госстандарт, 2006. – 10 с.
4. Черенки плодовых, ягодных культур, ореха грецкого и винограда. Технические условия: СТБ 1604-2006. – Введен 2006-05-01. – Минск: Госстандарт, 2006. – 9 с.
5. Саженьцы смородины черной, красной, белой и крыжовника. Технические условия: СТБ 1606-2006. – Введен 2006-05-01. – Минск: Госстандарт, 2006. – 9 с.
6. Рассада земляники. Технические условия: СТБ 1608-2006. – Введен 2006-05-01. – Минск: Госстандарт, 2006. – 8 с.

Дата поступления статьи в редакцию 17.03.2015