

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ САДОВОДСТВА,
ВИНОГРАДАРСТВА И ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

На правах рукописи

УДК 634.1[632.35+632.38](478)

ПРОДАНЮК ЛЕОНИД

**ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ
ЯБЛОНИ В СИСТЕМЕ СЕРТИФИКАЦИИ ПОСАДОЧНОГО
МАТЕРИАЛА ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР**

411.09-ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

Диссертация на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Научный руководитель: _____ **Волощук Леонид**

доктор хабилитат биологических наук

профессор исследователь

Научный консультант: _____ **Даду Константин**

доктор хабилитат сельскохозяйственных наук

конференциар исследователь

Автор: _____ **Проданюк Леонид**

Кишинёв, 2016

**INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI
TEHNOLOGII ALIMENTARE**

Cu titlu de manuscris

CZU 634.1[632.35+632.38](478)

PRODANIUC LEONID

**DIAGNOSTICUL VIRUSULUI STRIERII LEMNULUI
MĂRULUI ÎN SISTEMUL DE CERTIFICARE A
MATERIALULUI SĂDITOR POMICOL**

411.09 – PROTECȚIA PLANTELOR

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific: _____ **Volosciuc Leonid**

Doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Consultant științific: _____ **Dadu Constantin**

Doctor habilitat în științe agricole,
conferențiar cercetător

Autorul: _____ **Prodaniuc Leonid.**

Chișinău, 2016

© Леонид Проданюк, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ (русский, румынский, английский).....	6
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	9
ВВЕДЕНИЕ	10
1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ИЗУЧЕННОСТИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ	18
1.1. История изучения, круг растений хозяев, эпидемиология, экономическое значение ...	18
1.2. Диагностика ВЯДЯ биологическими методами	37
1.3. Диагностика ВЯДЯ иммунологическими и молекулярно-генетическими методами ...	39
1.4. Выводы к главе 1	42
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
2.1. Материалы исследований	44
2.2. Методы исследований	45
2.2.1. Выявление и перенос вируса, на древесные и травянистые индикаторы	45
2.2.2. Получение очищенных препаратов вируса, иммунизация кроликов и оценка качества антисывороток	47
2.2.3. Иммунологические и молекулярно-генетические методы диагностики ВЯДЯ	49
2.3. Схема закладки эксперимента	55
2.4. Выводы к главе 2	56
3. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ (ВЯДЯ)	57
3.1 Выявление изолятов вируса, перенос и накопление вируса на древесных и травянистых индикаторах	57
3.2. Получение очищенных препаратов вируса ямчатости древесины яблони	69
3.3. Получение и определение качества антисыворотки	75
3.4. Выводы к главе 3	78
4. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ	79

4.1. Оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа.....	79
4.2. Усовершенствование и оптимизация метода иммуносорбентной электронной микроскопии	85
4.3. Оптимизация метода полимеразной-цепной реакции (ОТ-ПЦР)	90
4.4. Оптимизация метода «Immunocapture» и оценка экономической эффективности его применения	93
4.5. Выводы к главе 4	97
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	99
БИБЛИОГРАФИЯ	101
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	113
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Выписка из заседания учёного совета НПИСВиПТ, об утверждении оптимизированных методов.....	113
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Приказ Министерства Сельского хозяйства об абилитировании лаборатории вирусологии Института Плодоводства на проведение тестирования посадочного материала на наличие вирусов.....	114
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Акт внедрения результатов работы в НПИСВиПТ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Акт тестирования в НПИСВиПТ	116
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Акт внедрения результатов работы в ГТ „Melnic Ioana Feodor”	117
ПРИЛОЖЕНИЕ 6. Акт тестирования подвоев в ГТ „Melnic Ioana Feodor”	118
ПРИЛОЖЕНИЕ 7. Акт тестирования сортов в ГТ „Melnic Ioana Feodor”	119
ПРИЛОЖЕНИЕ 8. Акт внедрения результатов работы ГТ „Cebotari Feodor Mihail”	120
ПРИЛОЖЕНИЕ 9. Акт тестирования подвоев в ГТ „Cebotari Feodor Mihail”	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 10. Акт внедрения результатов работы в ГТ „Ghilinschii Dumitru”	122
ПРИЛОЖЕНИЕ 11. Акт тестирования подвоев в ГТ „Ghilinschii Dumitru”	123
ПРИЛОЖЕНИЕ 12. Акт внедрения результатов работы в SRL „Surinmih”	124
ПРИЛОЖЕНИЕ 13. Акт тестирования подвоев в SRL „Surinmih”	125
ПРИЛОЖЕНИЕ 14. Акт внедрения результатов работы в SRL „GelnacrAgro”	126
ПРИЛОЖЕНИЕ 15. Акт тестирования подвоев в SRL „GelnacrAgro”	127
ПРИЛОЖЕНИЕ 16. Вычисление статистических характеристик выборки при изучении качественных признаков	128
ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ	129
CURRICULUM VITAE	130

АННОТАЦИЯ

Проданюк Леонид. «Диагностика вируса ямчатости древесины яблони в системе сертификации посадочного материала плодовых культур», диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук, Кишинёв, 2016.

Структура диссертации. Введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, 100 страницах основного текста, 164 библиографических источника, 25 рисунков, 12 таблиц и 16 приложений. Результаты опубликованы в 11 научных работах.

Ключевые слова: вирус, ямчатость, яблоня, оптимизация, методы, семечковые породы, тестирование, сертификация.

Область исследований. Защита растений.

Цель работы. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони и применить их в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур, согласно европейским стандартам сертификации.

Задачи исследований. Выявить и идентифицировать вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони. Определить реакцию на перенос вируса ямчатости древесины яблони на травянистые индикаторы. Оптимизировать методику очистки вируса ямчатости древесины яблони. Разработать диагностическую антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Внедрить оптимизированные методы диагностики в систему сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Новизна исследований. Впервые в Молдове приготовлена высокоспецифичная антисыворотка, способная выявлять вирус ЯДЯ методом ИФА. Оптимизирован метод ПЦР для диагностики вируса ЯДЯ, на базе приготовленных диагностических антител проведён метод «Immunocapture», разработаны календарные сроки выявления вируса ЯДЯ.

Решенная важная научная проблема *состоит в научном обосновании методологических подходов, направленных на усовершенствование и оптимизацию методов диагностики ВЯДЯ в системе производства безвирусного посадочного материала.* На основании результатов исследований специфичности полученных антисывороток, усовершенствования оптимизированных методов и определения календарных сроков проведения тестирования ВЯДЯ, *что позволило разработать, усовершенствовать и применить оптимизированные методы в системе сертификации безвирусного посадочного материала семечковых культур.*

Теоретическое значение работы состоит в разработке и усовершенствовании надёжных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони, для тестирования и ретестирования плодового посадочного материала, что послужит в качестве теоретической основы экспресс методов тестирования двух других латентных вирусов яблони. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики позволит решить ряд теоретических и практических задач по переводу плодового питомниководства на международные нормы сертификации.

Практическая значимость: полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать применение оптимизированных методов в работах по получению безвирусных клонов с целью перевода питомниководства республики на безвирусную основу и международные нормы сертификации.

Внедрение научных результатов: внедрены в лаборатории вирусологии НПИСВиПТ и широко применяются в работах по получению безвирусных клонов, и в хозяйствах республики: SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” в питомниках семечковых культур.

ADNOTARE

Prodaniuc Leonid –«Diagnosticul virusului strierii lemnului mărului în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol», teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2016.

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 164 titluri, 25 de desene, 12 tabele, 16 anexe, 100 de pagini de text de bază. Rezultatele obținute sunt publicate în 11 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: virus, strierea, măr, optimizarea, metode, specii semincere, testare, certificare.

Domeniul de studiu: Protecția plantelor.

Scopul tezei: Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului, și aplicarea lor în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol de specii semincere, conform standardelor europene de certificare.

Obiectivele cercetării: depistarea și identificarea tulpinilor virulente a virusului strierii lemnului mărului. Determinarea reacției indicatorilor erbacei la transferul virusului strierii lemnului mărului pe ei. Optimizarea metodicii de purificare a acestui virus. Obținerea antiserului diagnostic către virusul strierii lemnului mărului. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului. Implementarea metodelor optimizate de diagnosticare în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol de specii semincere.

Noutatea științifică: Pentru prima dată în Moldova a obținut un antiser cu specificitate înaltă cu capacitatea de a depista VSLM prin metoda analizei imunoenzimatică. Sa optimizat metoda reacției în lanț a polimerazei pentru diagnosticarea VSLM, în baza anticorpilor diagnostici obținuți sa efectuat metoda “immunocapturare” sau determinat termenii calendaristici de depistare a VSLM.

Problema științifică soluționată constă în argumentarea științifică a procedurilor metodologice, axate spre perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului SLM în sistemul de producere a materialului săditor devirozat. În baza rezultatelor studierii specificității antiserelor obținute, perfecționării metodelor optimizate și determinării termenilor calendaristici pentru efectuarea testării virusului SLM, sau elaborate, perfecționat și aplicat metodele optimizate în sistemul de certificare a materialului săditor devirozat de specii semincere.

Importanța teoretică a lucrării constă în elaborarea și perfecționarea metodelor, sigure de diagnosticare a virusului SLM pentru testarea și retestarea materialului săditor pomicol ceea ce va fi la baza teoretică, a metodelor expres de testare a altor două, viroze latente a mărului. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare va permite de a rezolva un șir de sarcini teoretice și practice pentru transferul pepinieritului pomicol la normele internaționale de certificare.

Valoarea aplicativă a cercetărilor: Datele experimentale obținute permit a recomanda utilizarea metodelor optimizate în lucrările pentru obținerea clonelor devirozate cu scopul transferului pepinieritului Republicii Moldova în baza materialului devirozat și normelor internaționale de certificare.

Implementarea rezultatelor științifice: au fost implementate în Laboratorul de virusologie al IȘPHTA, unde sunt utilizate pe larg la lucrările pentru obținerea clonelor devirozate, și în gospodăriile republicii SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GTJ „Melnic Ioana Feodor”, GTJ „Cebotari Feodor Mihail”, GTJ „Ghilinschii Dumitru” în pepinierele speciilor semincere.

ABSTRACT

Prodaniuc Leonid. “Diagnostics of the Apple stem pitting virus in the certification system of the fruit planting material “

Thesis for the degree of Doctor in Biological Sciences, Chisinau, 2016, consists of the introduction, four chapters, the main conclusions and recommendations, bibliography of 164 sources. The work is presented on 100 pages of the main text; it contains 12 tables, 25 figures and 16 supplements. The results within the dissertation were published in 11 scientific articles.

Key words: virus, pitting, apple, optimization, methods, fruit seed species, testing, certification

Domain of research: Plant protection.

Aim of research: To improve and optimize the diagnostics methods of the Apple stem pitting virus and apply them in the system of fruit seed planting material certification according to the European certification standards.

Objectives: Isolation and identification of the virulent strains of the apple stem pitting virus. Determination of the reaction on the apple stem pitting virus transmission to the herbal indicators. Optimization of the apple stem pitting virus purification method. Elaboration of the diagnostic antiserum for the apple stem pitting virus. Improving and optimization the apple stem pitting virus diagnostic methods. Implementation of the optimized diagnostic methods in the system of certification of fruit seed planting material.

Scientific originality. For the first time in the Republic of Moldova the highly specified antiserum, which is capable to determine ASPV using ELISA method, is prepared. The PCR method for ASPV diagnostics is optimized. The method «Immunocapture», based on the obtained diagnostic antibodies is carried out. The calendar dates for the ASPV determining are elaborated.

The important solved scientific problem consists in the scientific substantiation of methodological approaches of the elaboration and optimization of the ASPV diagnostics methods in the system of production of the virus-free planting material. The results of the study of the obtained antisera specificity, the implementing of the optimized methods and the determination of the calendar terms of the testing for the ASPV presence allowed to elaborate, improve and apply the optimized methods in the system of the fruit seed species virus-free planting material certification.

The theoretical significance consists in the elaborating and improving of the reliable methods of the apple stem pitting virus diagnostics, testing and re-testing of the fruit planting material, which serve as a theoretical basis for rapid testing methods of the other two latent apple viruses. Improvement and optimization of diagnostic methods will allow solving a number of theoretical and practical problems of transferring fruit nursery on the international certification standards.

The practical significance of the work. The obtained experimental data allow recommending the utilization of the optimized methods for getting the virus-free clones in order to transfer the Republic's nursery on the virus free basis and the international certification standards.

Implementation of scientific results: the obtained results are implemented in the Laboratory of Virology (PSIHFP) and are widely used in the virus-free clones obtaining and in the farmers SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” and in the fruit seed species nurseries.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

ВТМ – вирус табачной мозаики.

ВЯДЯ – вирус ямчатости древесины яблони.

ВБДЯ – вирус бороздчатости древесины яблони.

ВХПЛЯ – вирус хлоротической пятнистости листьев яблони.

ИСТВ – исполнительный совет таксономии вирусов.

ИФА – иммуноферментный анализ.

ИЭМ – иммуноэлектронная микроскопия.

НПИСВиПТ – Научно-Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий.

ОП – оптическая плотность.

ОТ-ПЦР – Обратная Транскрипция Полимеразной Цепной Реакции.

ПЖГ – пожелтение жилок груши.

ЯДЯ – ямчатость древесины яблони.

A – adenine.

ASPV – Apple Stem Pitting Virus

bp – base pairs (пар оснований).

BrCN –Cyanogen bromide.

C – citozin.

CLSV – chlorotic leaf spot virus.

DAS-ELISA – Double-Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid.

G – guanine.

IgG – imuno globulins G.

PBS – Phosphate buffered saline.

PVP25 – Polyvinylpyrrolidone.

R12740/7A - indicator plant.

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction.

SPY-227 – woody indicator plant *Malus pumila*.

T – timin.

ВВЕДЕНИЕ

Производство яблок, как и других фруктов, является экономически важным в экономике Республики Молдова. Значительным резервом увеличения производства и улучшения качества фруктов является эффективная защита насаждений от вредителей и болезней, среди которых особую роль занимают вирусные и вирусоподобные заболевания. Прямые потери урожая от них оценивают в 20-25%. Одновременно снижается качество продукции [10]. Уменьшается общая адаптивность растений к неблагоприятным факторам среды, особенно к недостатку влаги в почве и воздухе, а также к резким колебаниям температур в осенне - зимний период.

Вирусы отрицательно влияют на приживаемость глазков в питомнике и выход первосортных саженцев, на количество и качество отводков клоновых подвоев в маточнике и на их способность укореняться. Некоторые вирусы вызывают аномальное развитие пыльцы, частичную или полную её стерильность. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению завязывания плодов у заражённых растений, что особенно остро сказывается в годы с неблагоприятными погодными условиями в период цветения. Установлено, что многие возбудители вирусных и вирусоподобных заболеваний вызывают преждевременное отмирание растений. Нередко у поражённых деревьев развивается синдром несовместимости привоя и подвоя, что приводит к низкой продуктивности или полной гибели [1].

Вирусные болезни плодовых культур, в отличие от большинства грибных, являются хроническими и системными. Использование зараженных деревьев в качестве маточных с самого начала, приводит к производству посадочного материала, поражённого вирусами. При этом болезнь остаётся «наследственной», и такие саженцы никогда не смогут проявить все достоинства, заложенные в данном сорте и подвое. Более того, если вирусы, которыми заражены саженцы, имеют активных переносчиков, то каждое больное дерево в саду становится источником дальнейшего распространения инфекции.

Актуальность темы. Известно, что химические средства защиты, применяемые против грибных и бактериальных болезней, не эффективны в борьбе с вирусными инфекциями. Известно также, что вирусы не обладают собственным метаболизмом и для репродукции используют механизмы и процессы растения – хозяина. Поэтому все активные вещества, способные подавлять синтез вирусов в зараженных растениях, одновременно снижают и продуктивность растения. Современные же методы борьбы с ними основаны на отборе и размножении клонов, свободных от явного и скрытого заражения вирусами.

В свете сказанного, большое значение приобретают методы диагностики вирусов. Постоянное их совершенствование позволяет надёжно контролировать фитосанитарное состояние как базисных маточников, так и посадочного материала. В июне 2013 года в Мониторул Официал № 136-139 было опубликовано постановление Правительства № 415 об утверждении Норм по производству, контролю, сертификации и реализации материала для размножения и посадки плодовых культур. Этот документ гармонизирован с законодательными актами Европейского Союза и является обязательным условием интеграции Республики Молдова в Европейский Союз [3, 4].

Описание ситуации в области исследования и определение задач исследований. Поскольку химические средства защиты не эффективны против вирусных и вирусоподобных болезней, основные меры борьбы с ними направлены на получение исходных безвирусных клонов и их размножение в условиях защиты от вторичного заражения, то есть введение системы сертификации посадочного материала. Впервые такая система была разработана в США в середине прошлого века и успешно применена на практике, после многолетних эпифитотий, приведших плодородческую отрасль к опустошительным последствиям. В настоящее время в странах, где производство фруктов играет важную роль в экономике, эта задача решается в рамках национальных программ системы сертификации семенного и посадочного материала, что позволяет повысить продуктивность насаждений, а в ряде случаев, сократить площади садов [1]. В Молдове работы по получению безвирусных клонов и выращиванию оздоровленных саженцев плодовых культур были начаты во вновь созданной по инициативе профессора Д.Д. Вердеревского лаборатории вирусологии в середине 70-х годов прошлого столетия. За короткое время вирусологи Молдовы под руководством Т.Д. Вердеревской в тесном сотрудничестве с вирусологами Института фитопатологии в городе Ашерслебен (Германия) разработали технологию получения и размножения свободного от вирусов и вирусоподобных болезней посадочного материала, которая служила основой перевода плодового питомниководства республики на безвирусную основу. Однако разработанная технология не была реализована из-за перестроечных процессов 90-х годов прошлого столетия. Кризис, вызванный переходом экономики к рыночным отношениям, отрицательно отразился и на питомниководческой отрасли стратегических сельскохозяйственных культур Республики Молдова. Проблема качества приобрела особую актуальность, поскольку широкое развитие частного садоводства привело к

стихийному характеру производства и реализации посадочного материала, бесконтрольному ввозу в страну экономически нестабильных сортов. В связи с отсутствием системы надёжного контроля качества и фитосанитарного состояния маточных насаждений и импортируемого посадочного материала возникла угроза широкого распространения опасных для Молдовы вирусных, грибных и бактериальных заболеваний, а также их переносчиков.

Разработанная технология получения безвирусных клонов плодовых и ягодных культур послужила основой системы перевода Республики Молдова на безвирусную основу. Тем временем, европейские страны ввели единую систему сертификации, предусматривающую обмен и реализацию растительных ресурсов осуществлять сертифицированным, то есть свободным от вирусов и других хронических инфекций, посадочным материалом. Для Республики Молдова это грозило невозможностью обмена и экспорта растительным материалом без предварительного тестирования и оздоровления его с соблюдением международных норм и методов. В 1996 году Парламент Республики Молдова принял «Закон о Плодоводстве», который подвёл законодательную базу производства посадочного материала в Республике [5]. В данном документе указывалось также о необходимости перевода плодового питомниководства на безвирусную основу и международные нормы сертификации. Согласно норм сертификации плодового посадочного материала опубликованных в начале 90-х годов прошлого столетия странами европейской организации по защите растений, была вновь разработана [18, 30] схема отбора здоровых клонов, включающая в себя этап «Проверки на скрытое заражение, лабораторными методами» [26, 40]. Поэтому возникла необходимость в оптимизации существующих методов диагностики наиболее опасных для условий Молдовы вирусов плодовых культур [22]. В качестве объекта исследований был выбран один из наиболее распространённых латентных вирусов яблони - вирус ямчатости древесины яблони – *Apple stem pitting virus*.

Цель исследования. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони и применение их в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур, в соответствии с европейскими стандартами сертификации.

Задачи исследований

1. Выявить и идентифицировать вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони.

2. Определить реакцию травянистых индикаторов на перенос вируса ямчатости древесины яблони.
3. Оптимизировать методику очистки вируса ямчатости древесины яблони.
4. Разработать диагностическую антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони.
5. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони.
6. Внедрить оптимизированные методы диагностики в систему сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Методология научных исследований базируется на результатах теоретических и прикладных разработок, зарегистрированных и общепринятых на национальном и международном уровнях. Разработанные методологические подходы позволили использовать комплекс методов и приемов вирусологических исследований, направленных на идентификацию, определение иммунологических особенностей и оптимизацию диагностики ВЯДЯ, разработку приемов оздоровления и контроля качества посадочного материала с применением дескриптивных, статистических и аналитических методов. Они основываются на принципах оптимизации методов диагностики ВЯДЯ, способах применения оптимизированных методов в системе сертификации посадочного материала, концепции улучшения биологических качеств посадочного материала семечковых культур, а также способах повышения продуктивности плодовых семечковых насаждений в Республике Молдова.

Научная новизна и оригинальность. В результате исследований оптимизированы иммунологические методы ИФА и ИСЭМ и молекулярно-генетический метод ОТ-ПЦР. Получена высокоспецифическая поликлональная антисыворотка к ВЯДЯ. На базе полученной антисыворотки приготовлены диагностические наборы для проведения ИФА, с применением различных сорбентов для выделения фракции иммуноглобулинов IgG из сыворотки, в частности BrCN сефароза с протеином А и сефароза CL-4В протеин А. С применением полученных антисывороток, оптимизирован метод «immunocapture», позволяющий удешевить выделение антигена из растительного сока для проведения тестирования методом ОТ-ПЦР. Новыми являются также данные о том, что:

- ослабление растений индикаторов перед заражением, способствует хорошей передаче вируса,
- применение буферных смесей с добавками антиоксидантов для стабилизации окислительно-восстановительных процессов, увеличивает процент зараженных растений,

- выращивание заражённых растений травянистого индикатора в режиме короткого дня способствует лучшему накоплению вируса,
- применение при очистке вируса TRITON-X-100 увеличивает концентрацию вируса и приводит к раздроблению агрегированных частиц.

Применение сыворотки на стадии пробоподготовки ОТ-ПЦР удешевляет метод в 22,9 раза по сравнению с классическим выделением тотальной РНК.

Решенная важная научная проблема состоит в научном обосновании методологических подходов, направленных на усовершенствование и оптимизацию методов диагностики ВЯДЯ в системе производства безвирусного посадочного материала. На основании результатов исследований специфичности полученных антисывороток, усовершенствования оптимизированных методов и определения календарных сроков проведения тестирования ВЯДЯ это позволило разработать, усовершенствовать и применить оптимизированные методы в системе сертификации безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Теоретическое значение работы состоит в разработке и усовершенствовании надёжных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони для тестирования и ретестирования плодового посадочного материала, что послужит в качестве теоретической основы экспресс методов тестирования двух других латентных вирусов яблони. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики позволит решить ряд теоретических и практических задач по переводу плодового питомниководства на международные нормы сертификации.

Практическое значение работы состоит в применении оптимизированных методов в работах по отбору кандидатов в безвирусные клоны [38] для тестирования и ретестирования маточно–черенковых садов и подвойных маточников категории «Пребаза», «База» и «Сертификат» [66, 78]. Это значительно ускоряет перевод питомниководства Республики Молдова на безвирусную основу и европейские нормы сертификации плодового посадочного материала [78]. Полученные данные могут быть также использованы для оптимизации биологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов диагностики двух других латентных вирусов яблони в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Основные научные результаты, выдвигаемые на защиту.

1. Получение диагностической поликлональной антисыворотки к вирусу ямчатости древесины яблони.
2. Оптимизация условий проведения метода иммуноферментного анализа.

3. Оптимизация метода иммуносорбентной электронной микроскопии для диагностики ВЯДЯ.
4. Оптимизация метода полимеразной-цепной реакции для диагностики ВЯДЯ.
5. Применение метода «immunocapture» на стадии пробоподготовки ОТ-ПЦР.
6. Применение оптимизированных методов в системе сертификации плодового посадочного материала.

Апробация результатов. Материалы работы доложены и обсуждены на: заседании лаборатории вирусологии Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологии (14.07.2015), на VI Международной конференции «Биоресурсы и вирусы» г. Киев, Украина (14.17.2010), в рамках билатерального проекта «Молекулярно-биологический анализ вируса ямчатости древесины яблони в коммерческих насаждениях Молдовы и Украины и поиск устойчивых сортов» с кафедрой вирусологии Киевского национального университета им. Т.Г. Шевченко (10.11.2011), на Международной научной конференции посвященной «75-летию Олега Метлицкого». Москва, Россия (18.03.2013).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ: 5 статей в изданиях, рекомендованных Национальным советом по аккредитации и аттестации Республики Молдова, из них 2 без соавторов и 6 в международных изданиях.

Объём и структура работы: Работа изложена на 100 страницах машинописного текста и состоит из аннотаций на румынском, русском и английском языках, списка сокращений, введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследований, 2 главы собственных экспериментальных данных), общих выводов, практических рекомендаций, списка библиографии (164 литературных источника), и приложений. Работа содержит 25 рисунков и 12 таблиц.

Ключевые слова: вирус, ямчатость, яблоня, оптимизация, методы, семечковые породы, тестирование, сертификация.

Краткое изложение диссертации.

Основные разделы диссертации включают введение и 4 главы. Во введении отражены актуальность и значимость темы исследования, цели и задачи диссертации, методология научных исследований, научная новизна полученных результатов, решенная важная научная задача, теоретическая и практическая значимость работы, апробация результатов и выводы по каждой главе.

Краткое содержание диссертации. В главе 1 Анализ состояния изученности вируса ямчатости древесины яблони, изложен детальный анализ научных трудов и

синтез накопленных знаний в исследуемой области. Особое внимание уделено вопросам заболеваний, вызываемых вирусом ямчатости древесины яблони на различных семечковых породах, таких как яблоня, груша и айва, а также методам тестирования вируса ямчатости древесины яблони, принятых в мировой практике. Проанализированы методы идентификации вируса и применение их в производстве посадочного материала.

В главе 2. Материалы и методы исследования. Описаны материалы и методы исследования, использованные в работе, а также представлена схема проведенных исследований.

В главе 3. Усовершенствование и оптимизация биологических и биохимических методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Представлены результаты собственных исследований по результатам оптимизации биологических и биохимических методов. Установлено, что не все изоляты вируса ямчатости древесины яблони хорошо переносятся на травянистые индикаторы. В зависимости от вирулентности изолята, вида травянистого индикатора, фотопериода и температуры происходит различное накопление вирусных частиц. При очистке с травянистого индикатора удалось получить очищенный препарат вируса, пригодный для иммунизации кроликов с целью получения диагностической антисыворотки. Используемая нами схема иммунизации подопытных животных, которая состоит из трёх иммунизаций и двух реиммунизаций, позволила получить высокоспецифическую антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони.

В главе 4. Усовершенствование и оптимизация иммунологических и молекулярно-генетических методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Описаны полученные данные по оптимизации условий проведения метода иммуноферментного анализа для диагностики ВЯДЯ. Отработаны методы выделения IgG с применением различных сорбентов. Испытаны двух и трёх стадийные методы проведения ИФА для диагностики ВЯДЯ непосредственно в тканях плодовых растений. Установлено, что выявление исследуемого вируса методом двух стадийного ИФА, не даёт надёжных результатов, в то время как трёх стадийный метод позволяет идентифицировать ВЯДЯ в поражённых тканях семечковых культур в течение года. Оптимизированы два других метода выявления ВЯДЯ в тканях поражённых растений: иммунологический метод иммуносорбентной электронной микроскопии и молекулярно-генетический метод ОТ-ПЦР для диагностики ВЯДЯ. На базе антител, выделенных из диагностической антисыворотки, оптимизирован метод, позволяющий проводить пробоподготовку ОТ-ПЦР более дешёвым способом.

В результате исследований установлено, что диагностику ВЯДЯ в системе производства безвирусного посадочного материала целесообразно проводить биологическими, иммунологическими и молекулярно-генетическими методами, согласно установленным календарным срокам с применением рекомендуемых тканей растения.

Проведены расчёты экономической эффективности применения метода «immunocapture» на стадии пробоподготовки проведения ОТ-ПЦР.

1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ИЗУЧЕННОСТИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ

1.1. История изучения вируса ямчатости древесины яблони, круг растений хозяев, эпидемиология, экономическое значение

Вирус ямчатости древесины яблони (ВЯДЯ) *Apple stem pitting virus (ASPV)* является, типичным представителем рода *Foveavirus*, семейства *Betaflexiviridae* и распространён во всём мире, где возделываются семечковые породы [42]. ВЯДЯ относится к группе латентных вирусов поражающих яблоню. Термин «латентные вирусы» применяется к заболеваниям, которые не вызывают внешних симптомов, но оказывают влияние на рост и продуктивность сортов и подвоев. На яблоне описаны три латентных вируса: вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (ВХПЛЯ) *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)*, вирус ямчатости древесины яблони (ВЯДЯ) *Apple stem pitting virus (ASPV)*, вирус бороздчатости древесины яблони (ВБДЯ) *Apple stem grooving virus (ASGV)*.

В 50-х годах прошлого столетия в США впервые наблюдали схожую с морозобоинами рубцеватость кребовых яблонь, при прививке на них некоторых сортов. *Virginia crab* особенно сильно проявляла признаки несовместимости. Заболевание было названо ямчатостью древесины по симптому на древесине в нижней части ствола [144, 148]. Авторы предположили, что эта несовместимость вызвана вирусом, присутствующим латентно в сортах, к которым *Virginia crab* особенно восприимчива [78]. Они осуществили передачу патогена прививкой и таким образом доказали его вирусную природу. *Virginia crab* стали применять в качестве индикатора для обнаружения данного вируса, наличие которого в настоящее время установлено в Канаде, Англии, Швейцарии, Германии, Чехии, Болгарии, Молдове и в других странах.

В опытах Guengerich, Millikan [83] после инокуляции изолятом ВЯДЯ подвой *Spy-227* развил реакцию сходную с реакцией, которая наблюдалась при прививке на него некоторых сортов яблони. Летальное действие вируса замедлялось, если клон срезали до уровня инокуляционной почки. Это навело авторов на мысль, что фактором, ответственным за летальную несовместимость у яблони, может быть вирус ямчатости древесины.

Заражая вирусом ямчатости древесины *Virginia crab* [84,116] убедились, что для серии переносов ямчатости древесины удачными были только две комбинации: прививка-почка, в обоих случаях передача ямчатости древесины происходила. Прививая между собой ответвления корней спящих сеянцев, было установлено, что в поле возможна передача вирусов яблони при естественном срастании корней.

В экспериментах по переносу вируса ямчатости древесины семенами от больных растений *Virginia crab* и *Roben crab* проведенных Guengerich, Millikan и Welsh, Uyemoto [85,156] было показано, что ямчатость древесины не переносится семенами, а распространение ВЯДЯ происходит с использованием заражённого материала для размножения.

На опытном поле Клейн Альтендорф Института садоводства Боннского университета [59] обратили внимание на восьми летние деревья сортов Ингрид Мэри и Голден Делишес с сильными признаками несовместимости. Оба сорта были привиты на сеянцах с промежуточной прививкой сорта Маунзен. Пробы на срез показали, что древесина образованного Маунзеном штамба в продольном направлении изборождена многочисленными мелкими и крупными рубцами. Был проведён ряд опытов с данными сортами, заокулированными двойной окулировкой на *Virginia crab*. Через год на приросте *Virginia crab* с заражёнными глазками Ингрид Мэри появились слабые вмятины в древесине. Типичные рубцы развились непосредственно около места прививки через два года после окулировки. Положительные результаты опытов по переносу вирусов показали, что образующиеся в древесине Маунзен глубокие рубцы в месте спайки сорта Голден Делишес и Ингрид Мэри могут быть объяснены наличием вируса рубцеватости (ямчатости), который определён в Германии.

Обследования сада яблони [137] показали, что в период с 1957 по 1966 гг. симптомы ямчатости древесины развились на 16 из 90 чувствительных деревьев в саду. Пять из 16 деревьев были специально заражены в 1957 году почками и черенками взятыми с заражённых деревьев. Таким образом, Rich A.E. [137] установил, что вирус распространился естественным способом только на 11 деревьев (12%) тогда как 74 дерева (82%) остались, очевидно, здоровыми. Форма распространения подтверждает, что корневые прививки могут считаться важным естественным способом переноса вируса и что, вероятно, насекомые не имеют значения в распространении вируса.

В период с 1964 по 1967 год в Институте защиты растений в городе Костинброд (Болгария) проводили исследования подвоев и сортов яблони [45] на предмет обнаружения вируса ямчатости древесины яблони и выявления способов его передачи. Всего было исследовано 904 дерева на семенных подвоях, из которых 340 получены двойной окулировкой с верхней почкой *Virginia crab* и 505 обыкновенной окулировкой наиболее распространенными сортами яблони и вегетативными подвоями и 59 деревьев, полученных обыкновенной окулировкой почкой *Virginia crab*. Из 340 деревьев *Virginia crab* зараженных методом двойной окулировки почками различных сортов и подвоев 45

деревьев или 13,2%, проявили симптомы только на подвое и 44 дерева, или 12,9%, на привое и подвое. Процент деревьев *Virginia crab* проявивших симптомы только на подвое и привое составил 26%, т.е. каждое 4 дерево было с симптомами поражения. Из 505 деревьев 38 или 7,1% проявили симптомы, описанные на семенных подвоях. При анализе полученных данных было допущено, что вирус ямчатости древесины яблони передаётся семенами. Для того чтобы удостовериться, что ВЯДЯ передаётся семенами, была удалена кора 365 двух годичных сеянцев и девять культурных сортов яблони. Ни на одном из просмотренных деревьев не были установлены симптомы ВЯДЯ. Проверка 306 трёх летних саженцев яблони так же выявила отсутствие симптомов. Все проведённые исследования показали, что ВЯДЯ не передаётся семенами, и семенные подвои им не заражены.

В 1967-1971 годах проводилась проверка на зараженность латентными вирусами районированных в Молдавской ССР сортов и подвоев яблони, а также некоторых гибридов и диких видов [8]. Образцы были взяты из коллекционных садов Молдавского Научно-исследовательского института садоводства, виноградарства и виноделия, Бельцкого сортоучастка и на станции ВИРа в Бахчисарае (Крым). Все опыты проводились в питомнике методом двойной окулировки на подвое *Malus sylvestris*. В качестве индикаторов использовали *Virginia crab K6*, *Malus platycarpa*, R- 12740/7A, и SPY-227 в пятикратной повторности. Учёты проводились в 1969–1972 годах весной и осенью. Вирус ямчатости древесины яблони был обнаружен в 40 образцах из 60. На индикаторе *Virginia crab* вирус ямчатости вызывал симптомы ямчатости различной интенсивности. Большинство образцов вызывали ямчатость на привое, однако 6 образцов вызвали образование симптомов на подвое. Симптомы ямчатости древесины наблюдали также на *Malus platycarpa* и SPY-227. В некоторых случаях сильное проявление ямчатости *Malus platycarpa* сопровождалось сильной карликовостью и наоборот, при слабой ямчатости наблюдалась слабая карликовость. Однако ряд образцов вызывали симптомы ямчатости без проявления карликовости. Ямчатость древесины на SPY-227 сопровождалась некрозами коры. В ряде случаев ямчатость древесины SPY-227 коррелировала с проявлением отмирания SPY-227. На индикаторе SPY-227 симптомы проявились в виде эпинастий листьев в первый год после заражения. Во второй год наблюдалось отмирание верхушек побегов. Листья были мелкие хрупкие и хлоротичные. Таким образом, в результате тестирования было установлено, что на сортах и подвоях яблони в Молдавской ССР широко распространены латентные вирусы яблони и, в частности, вирус ямчатости

древесины яблони. В Молдавской ССР вирус ямчатости древесины яблони впервые описан в 1969 году [14].

По данным Стоуфера 1972-1973 [145] начиная с 1969, в отдельных отдельных районах Пенсильвании и соседних штатах, сообщали об активном последующем отмирании некоторых клонов Ред Делишес на подвое ММ-106. Эта проблема встречалась и на других привойно-подвойных комбинациях и географически была распространена более широко. Отмирающие деревья, проявляли симптомы обычно связанные с кольцеванием ствола или верхушки, а именно жёлтой окраской листьев, измельчением их, короткими междоузлиями, обильным цветением и большим количеством мелких, сильно окрашенных плодов. Большинство пораженных деревьев трескались или ломались в месте спайки. Проверка нижней части ствола позволила установить присутствие слабого поражения коры в месте соединения привоя с подвоем. Удаление коры показало, что поражение проникает в древесину и некротическая ткань коры врезается в трещины. Для этого синдрома было предложено название некроз спайки. Растения, пораженные некрозом спайки, обычно давали большое количество поросли у подвоя. Верхушечные молодые листья этих побегов, были использованы как источник инокулюма для механического переноса на травянистые индикаторы. На основе симптоматиологии, физических свойств и серологических реакций, вирус был идентифицирован как вирус кольцевой пятнистости томатов. Окончательно не доказано, является ли вирус кольцевой пятнистости томатов причиной некроза спайки. Однако сходство между симптомами ямчатости косточковых и некрозом спайки яблони и предполагает возможность того, что оба нарушения могут вызываться штаммами вируса кольцевой пятнистости томатов.

В Румынии в период с 1969 по 1973 год в Институте Плодоводства города Питешть-Мэрэчинень и на опытной станции Плодоводства в городе Быстрица проводили исследования [2] вегетативных и генеративных подвоев яблони, часто используемых в названной стране, а также серии менее используемых вегетативных подвоев, которые могли бы применяться в будущих работах по производству безвирусного посадочного материала. Тестирование проводили на 20 типах вегетативных подвоев и 7 сеянцевых клонов из местных сортов. Подвои для тестирования были привиты окулировкой, используя по 10 глазков, на древесные индикаторы. Для каждого индикатора, контроль окулировали на *Malus domestica*, предварительно тестированной и признанной безвирусной. Учёты проводили ежегодно, отмечая появление и развитие симптомов на листьях, коре, древесине побегов индикаторов, а также рост и развитие индикаторов в

питомнике тестирования в течение 3–4 лет. В результате были найдены свободные от вируса подвой ММ-102; ММ-104; ММ-106; ЕМ-26. Слабую реакцию на вирус хлоротической пятнистости листьев яблони и вирус ямчатости древесины яблони на SPY-227 вызвали тип ММ-103, а типы ММ-101 и ММ-109 почти на всех индикаторах вызвали вирусную реакцию.

В процессе массового тестирования сортов и подвоев по симптомам на древесных индикаторах *Virginia crab* и SPY-227 вирус впервые обнаружен в Казахстане [36]. Данные опытов по зараженности сортов и подвоев возбудителями ямчатости древесины и отмирания SPY-227, как правило, совпадали, что согласовалось с мнением об идентичности возбудителей этих заболеваний. Имевшиеся отклонения в 7,1%, видимо, были связаны со штаммовым разнообразием изолятов вируса [35].

Вирус ямчатости древесины яблони в Таджикистане был обнаружен в процессе массового тестирования сортов и подвоев и идентифицирован по симптомам на древесных индикаторах *Virginia crab* и SPY-227 [41].

В работах по термотерапии Wood G. A. [160] обнаружено различие в термочувствительности вирусов яблони. Хотя устранение определённых вирусов из сортов с множественным заражением не всегда точно следует в одной и той же последовательности, ямчатость древесины и отмирание SPY-227 наиболее трудно устранимы и иногда для получения свободного от заражения сорта требовалась повторная термотерапия.

По данным Minoiu N [6] ВЯДЯ в латентном состоянии найдены у 69% клонов яблони и вегетативных подвоев. Полностью зараженными оказались сорта Старкримсон, Голден Делишес, и др., а также подвой ЕМ-9. Частично заражены клоны сортов Мельба, Джонатан, Калтер, и подвой ЕМ-4, ММ-11. Свободными были клоны сортов Машанский, Пэтул и подвой ЕМ-26, А-2, и ММ-106. Автором указывается на то, что ямчатость древесины яблони термотолерантен при +38⁰С. Химиотерапией удалось удалить вирус из зараженных клонов. Заложены маточные насаждения для размножения.

Результаты исследований Welsh M. F., Uyemoto J. K [158] по передаче на древесные и травянистые индикаторы, показали что, по меньшей мере, три переносимых прививкой агента, могут вызывать нарушения ксилемы *Virginia crab*. Симптомы вызванные ими были ямчатость древесины, бурая линия, отмирание и некротическая ямчатость места спайки. Вирусы отличаются, по способности сохраняться во время термообработки. Ямчатость древесины проявляется на древесине *Virginia crab* в виде ямок в ксилеме, которым соответствуют выступы тканей флоэмы. Стойкие различия в

силе проявления ямчатости между различными изолятами и наводили авторов на мысль о наличии штаммов или на то, что ямчатость может вызываться разными возбудителями.

При проверке 36 сортов кребовых яблонь на заражённость вирусами яблони [80] симптомы ямчатости древесины встречались на 19 сортах. Эти результаты следует учитывать, при отборе в качестве опылителей кребовых сортов, так как они могут заражаться вирусами благодаря естественной передаче корневыми прививками от заражённых сортов яблони.

F.A.van deer Meer [79] в 1985 на XIII Международном совещании по вирусным заболеваниям плодовых культур сделал сообщение об переносе возбудителя ВЯДЯ на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37 В, который в ответ на заражение проявлял системные симптомы на отрастающих листьях в виде просветления жилок 2 и 3 порядка и жилковую мозаику. Вирус также был перенесён на травянистый индикатор *Chenopodium murale*, на котором симптомы проявились в виде локальных пятен на натёртых листьях. Это было первое сообщение о вирусной этиологии болезни ямчатости древесины яблони. Используя выделенные F.A.van deer Meer [79] изоляты ВЯДЯ, японские исследователи Koganezawa и Yanase [103] в 1991 году изучили морфологию частиц и приготовили антисыворотку для диагностики ВЯДЯ иммунологическими методами. С развитием молекулярных методов определения заболеваний плодовых культур в литературе стали появляться работы по выявлению ВЯДЯ с использованием ПЦР.

В экспериментах по клонированию ДНК и РНК вирусов ВЯДЯ и ПЖГ Jelkmann W., и др. [92] выделили тотальные РНК, а затем методом обратной транскрипции получили ДНК и провели ПЦР обоих изолятов. Автор приготовил антисыворотку к ВЯДЯ при помощи которой, выявил возбудителей ямчатости древесины яблони и просветления жилок груши. Результаты экспериментов по гибридизации представляют доказательство вирусной этиологии этих двух заболеваний и показывают, что оба заболевания вызываются одним патогеном вирусом ямчатости древесины яблони.

Изучая влияние заражённости вирусов на рост и продуктивность яблони Татариновым А. [34] на Крымской опытной станции было установлено, что вирусы, присутствовавшие в латентной форме, снижают продуктивность сорта Голден Делишес на 20,1%-26,1%.

В. Jelkman [90] изучил нуклеотидные последовательности ВЯДЯ и ПЖГ, а также связи с *potex* и *carla* вирусами, для определения взаимосвязи между ними. Результаты

показали, что ПЖГ вызывается штаммом ВЯДЯ который не попадает в подгруппу А кластеровирусов и, вероятно, принадлежит к ещё неопределённой группе вирусов.

В работе James and Sharon [89] по перекрёстной серологической реакции антител к вирусу шарки сливы и вирусу ямчатости древесины яблони авторами было показано, что вирус ямчатости древесины яблони декорируется антителами к вирусу шарки сливы проведённые эксперименты подтверждены фотографиями, сделанными с помощью электронного микроскопа.

Klerks [101] с помощью амплификации РНК и зондирования с флюоресцентными молекулярными метками, использовал систему Ampli Det RNA для быстрого геля обнаружения ямчатости древесины яблони в тканях яблони. Система основана на специфической амплификации вирусной РНК с помощью последовательности нуклеиновых кислот и одновременного обнаружения флюоресцентного продукта амплификации с помощью молекулярных меток. Эффективность этого метода для обнаружения вируса ямчатости древесины яблони в сортах Голден Делишес и Графенштейнское сравнили в течение года с механической инокуляцией ВЯДЯ на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37 B, являющийся индикатором для данного вируса. Результаты экспериментов показали, что только применение системы Ampli Det RNA позволяло последовательно обнаруживать вирус в тканях коры независимо от времени года.

Исследования, проведённые в институте Плодоводства Praga-Ruzyni Чехия [110] по выявлению вируса ямчатости и бороздчатости древесины яблони методом ОТ-ПЦР показали, что из четырёх сортов яблони, взятых из сада возраста 25 лет, в сорте Спартан, из 20 проверенных деревьев в 16 была обнаружена смешанная инфекция обоих вирусов. В сорте Айдаред в 13 из протестированных 20 деревьев была обнаружена смешанная инфекция. Применение метода ОТ-ПЦР с обратной транскрипцией было успешно использовано, для обнаружения вируса ямчатости древесины яблони и вируса бороздчатости древесины яблони.

Для быстрого и однородного обнаружения вируса ямчатости древесины яблони, с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени и флюорогенного праймера авторами показано, что применение флюорогенных зондов гидролиза 5' нуклеазы, всё чаще используется как для обнаружения возбудителей, так и в диагностических целях [141]. Тем не менее, размер зондов из 25–40 нуклеотидов может ограничить их использование для обнаружения патогена, с высокой изменчивостью генома. Использование модифицированного короткого зонда позволило увеличить стабильность дуплекса и

повышения температуры плавления до значения, подходящего для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени.

Чтобы обеспечить быстрое и широкомасштабное тестирование яблони и груши на вирус ямчатости древесины яблони, Gugerli, Ramel [86] разработали получение моноклональных антител к вирусу ямчатости древесины яблони и к пожелтению жилок груши. Оценку специфичности антител проверяли методом DAS-ELISA. Проверялись изоляты вирусов заранее перенесённых на *N. occidentalis* 37B, а также изоляты, выделенные из яблони и груши. Авторы указывают, что данным методом можно обнаружить вирус ямчатости древесины яблони в семенах яблони. Полученные антитела позволили выявить ВЯДЯ и ПЖГ в древесине в состоянии покоя в зимнее время.

При тестировании клоновых подвоев и сортообразцов груши в Украине [33] на наличие ВХПЛЯ и ВЯДЯ методом ИФА было установлено, что клоновые подвои груши ВА-29, ИС 2-10, ИС 4-6, ИС 4-12 в маточнике свободны от латентных вирусов. Отдельные кусты клоновых подвоев груши ВА-29 и ИС 4-12 были заражены вирусом ХПЛЯ.

Осенью 2004 года на северо-западе Греции в саду айвы наблюдались симптомы деформации и каменистости плодов айвы [114]. Пробы листьев были проверены на наличие вируса ямчатости древесины яблони. Тестирование проводили методом ОТ-ПЦР. Последующее прямое секвенирование одного продукта ОТ-ПЦР подтвердило наличие ВЯДЯ путём выявления 85% идентичности аминокислотной последовательности с соответствующим участком генома грушевого изолята ВЯДЯ.

При проведении работы по обнаружению, распространению и генетическим различиям вируса ямчатости древесины яблони в Чехии Kundu J [109] было проведено тестирование образцов методом ОТ-ПЦР. Проведён филогенетический анализ родства изолятов. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей 3'конца генома и филогенетический анализ показали высокую гомологичность между чешскими изолятами. Идентичность последовательностей колебалась от 94% до 100%.

Проверка семечковых плодовых насаждений Австралии [139], показала широкое распространение ВЯДЯ и БДЯ. Образцы были протестированы с помощью метода ОТ-ПЦР. Анализ последовательностей генома австралийских изолятов ВЯДЯ показал изменения последовательности в пределах от сходства последовательностей 76-96%. Эти результаты показывают, что генетические вариации между вирусными штаммами могут повлиять на надежность молекулярных тестов для ВБДЯ и ВЯДЯ. По мнению авторов, для сертификации посадочного плодового материала семечковых пород может быть

полезно продолжать использовать индексацию на древесных индикаторах в сочетании с тестами ОТ-ПЦР.

Идентификация латентных вирусов на клоновых подвоях яблони и груши в условиях Центрально-Черноземной зоны России методами ИФА и ОТ-ПЦР позволила установить, что они заражены вирусом ямчатости древесины яблони в среднем на 14,7% [31, 32, 37, 39].

Биологическая индексация сортов Анна ЕФ, клона 263/2 и Красота Огайо 270/6В, отобранных в округах Бразилии [135], показала, что данные сорта и клоны заражены вирусом ЯДЯ. Выделение тотальной РНК и проведение ОТ-ПЦР подтвердило факт заражения. Изучение нуклеотидной последовательности гена белка оболочки вируса показало высокое сходство последовательностей с ВЯДЯ в GenBank (архивная база данных, содержащая аннотированные последовательности ДНК и РНК).

Обследования яблоневого и грушевого садов Египта [163] с целью выявления ВЯДЯ показали, что процент заражения составляет 13-17%. Тестирование образцов проводилось методом ОТ-ПЦР с применением праймеров, подобранных заводом-производителем диагностического набора [134].

В результате изучения молекулярной и биологической характеристики ВЯДЯ, вызывающего просветление жилок груши в Тайване было установлено, что изоляты, выделенные из груши, на 74,8-91,2% сходны по нуклеотидным последовательностям с изолятами ВЯДЯ, выделенными из яблони. Это первый доклад о ВЯДЯ на груше в Тайване [164].

Используя Ribovirin для проведения химиотерапии в культуре *in vitro* для оздоровления сортов груши, Александр Лукас, Бохемика, Электра [142] Sedlak установил, что используя Ribovirin в концентрации 20 мг и отбор апикальной меристемы размером 3 мм, удаётся избавиться от ВЯДЯ, но эти результаты являются предварительными.

В 2011 году были проведены исследования по изучению распространённости ВЯДЯ в насаждениях яблони в Молдове [19]. Общая площадь обследованных насаждений составляла 75 га. Методом ИСЭМ было протестировано 805 образцов, из которых 122 были заражены ВЯДЯ, что составляло 14,1%. Отобранные изоляты были проверены ОТ-ПЦР методом.

Первоначально ВЯДЯ был отнесён к субгруппе А кластеровирусов. В дальнейшем при пересмотре таксономии вирусов растений ВЯДЯ был выведен из субгруппы А и сформировано два новых рода вирусов *Trihovirus* и *Vitivirus*. Только молекулярно биологические исследования позволили выяснить полную картину генома ВЯДЯ и

продемонстрировали уникальность РНК вируса ЯДЯ в сравнении с геномами других нитеподобных РНК-содержащих вирусов растений. Так ВЯДЯ послужил стимулятором образования новой таксономической единицы рода *Foveavirus* (с лат. яма, впадина), что и было зафиксировано в ИСТВ в 1998 году [153]. Уже в 2004 году род *Foveavirus* органично влился во вновь образованное семейство *Flexiviridae*. Сейчас вирус принадлежит к роду *Foveavirus*, семейства *Betaflexiviridae*, порядку *Tymovirales* [152]. Вирионы ВЯДЯ гибкие, нитеобразные, не имеют суперкапсидной оболочки. Модальная длина вирионов составляет 800 нм, диаметр вирионов 12-15 нм.

Вирионы ВЯДЯ могут агрегировать конец в конец. Морфологические структуры могут достигать в длину 800, 1600, 2400, 3200 нм и находиться в инфицированных клетках. Капсид ВЯДЯ построен по ротационно-трансляционному типу симметрии.

Геном ВЯДЯ имеет размер 9300 оснований, состоит из одной молекулы одноцепочечной линейной РНК, полиаденилированной с 3' конца. Этот некодирующий регион содержит всего 132 нуклеотида, не считая полиаденилированного конца. В начале 5' региона есть некодирующая последовательность длиной 59 нуклеотидов [108]. РНК имеет молекулярную массу $3,1 \times 10^6$ Да, окружена капсидным белком, который имеет массу 48000 Да и состоит из 27,6% - аденина, 20,0% - цитозина, 23,4% – 23,8% - гуанина, 28,6 – 29% - урацила [42].

Инфекция, вызванная ВЯДЯ, приводит к цитоплазматическим изменениям в клетке. С помощью электронной микроскопии в препаратах визуализируются гибкие нитевидные вирионы длиной 800 нм. Вирусы локализуются в мезофилле или эпидермальной паренхиме инфицированных клеток *Nicotiana occidentalis* 37B [113].

Работы по изучению цитопатологии ВЯДЯ в растении *Nicotiana occidentalis* 37B Kundu [107] выявили наличие вирусных частиц длиной 800 нм и 3200 нм. Наблюдалось агрегирование вирусных частиц конец в конец, чем и объяснялась их длина в 3200 нм, а также формирование мембранных везикул и разрастание эндоплазматического ретикула.

В клетках вирионы могут быть случайно расположены или могут образовывать компактные массы, в том числе кристаллы. Такие агрегаты вирионов ВЯДЯ с разнообразными характеристиками неоднородных включений в инфицированных клетках *Nicotiana occidentalis* 37B были описаны доктором Yanase [161].

Определённые штаммы вируса ЯДЯ являются возбудителями следующих заболеваний яблони, груши и айвы: отмирание SPY-227 (*SPY 227 epinasti and decline*), пожелтение жилок груши и красной пятнистости (*Pear vein yellow and red mottle*),

сажистой кольцевой пятнистости айвы (*Quince sooty ring spot*), каменистости плодов груши (*Pear stony pit*), зелёной морщинистости плодов яблони (*Apple green crinkle*).

Вирус ямчатости древесины яблони поражает яблоню (*Malus sylvestris*) и 18 диких видов (*Malus*), грушу (*Pyrus domestica*) и 16 диких видов, айву (*Cydonia oblonga*, *Pyronia veitchii*).

Симптомы ямчатости древесины можно наблюдать только на отдельных сортах яблони, и наиболее отчётливо на сорте Вирджиния крэб и ряде других крэбов (Бэти крэб, Флоренс крэб, Хислоп крэб, Кола крэб), а также на сортах Голден Делишес и Маунзен. На древесине ствола появляются различной формы, длины и глубины ямки, которые, в зависимости от штамма вируса, расположены вблизи места прививки или распространяются по всему штамбу, переходя на скелетные ветви заражённых растений.

На индикаторе SPY-227 вирус ямчатости вызывает продолговатые трещины в древесине штамба и скелетных ветвей, которые заканчиваются некрозами коры, что приводит к прогрессирующему усыханию растений. После заражения SPY-227 методом двойной окулировки сильными штаммами вируса на следующий год наблюдается скручивание листьев верхушками внутрь (эпинастии), торможение роста побегов и быстрое усыхание, начиная с верхушки побега. В случае массированного заражения однолетних саженцев симптомы развиваются мягче, и отмирание растений наступает очень медленно. Сильные штаммы вируса ямчатости древесины вызывают деформацию и складчатость плодов сортов Ренет Симиренко и Вирджиния крэб, измельчение, деформацию и зелёную морщинистость сорта Кола крэб и поражение плодов сортов Первенец Самарканда, Саратони, Регистани.

Пожелтение жилок груши и красная пятнистость листьев груши (*Pear vein yellow and red mottle*). Заболевание вызывает хлоротичное окаймление или крапчатость вдоль мелких вторичных и третичных жилок листьев груши. В зависимости от чувствительности сорта симптомы могут быть отчётливыми или появляться кратковременно. Они лучше выражены на однолетних и двулетних саженцах в питомнике и на молодых деревьях в саду. На взрослых плодоносящих деревьях болезнь чаще присутствует в латентной форме. Климатические и погодные условия также оказывают заметное воздействие на проявление симптомов: на юге и в годы с жарким и сухим летом симптомы бывают ярче, [68] а в годы с холодным и дождливым летом болезнь может остаться в латентной форме.

В конце лета или в начале осени на листьях деревьев, заражённых пожелтением жилок, часто появляется красная крапчатость вдоль жилок в тех местах, где ранее была хлоротичная пятнистость.

В Молдавской ССР впервые заболевание описано Вердеревской Т. [14]. Проверка на скрытое заражение этим вирусом сортообразцов груши из Молдавии и Крыма показала, что зараженность промышленных сортов составляет 82%.

Пожелтение жилок и красная пятнистость листьев груши впервые обнаружены и описаны в Англии [134]. Первоначально предполагали, что это редкое и маловредоносное заболевание [131]. Дальнейшее изучение показало, что болезнь распространена широко и в настоящее время описана в большинстве стран, где культивируется груша [105].

Сажистая кольцевая пятнистость айвы (*Quince sooty ring spot*). Сорта и сеянцы айвы проявляют различную чувствительность к заболеванию. Наиболее восприимчивы клоны айвы Е и индикаторный клон С 7/1. У этих клонов характерные симптомы заболевания развиваются в следующей последовательности: сначала молодые весенние листья скручиваются верхушками внутрь (эпинастии), затем на кутикуле появляется тёмный пигмент, окружающий жилки, и хлоротичные пятна. Это тёмное окаймление и дало название заболеванию-сажистая пятнистость.

Заболевание впервые описано в Англии [133], вскоре было обнаружено во всех странах, где выращивают айву.

При изучении этиологии и взаимоотношений между рядом заболеваний яблони и груши установлено, что возбудителем сажистой кольцевой пятнистости айвы является вирус ямчатости древесины яблони [99].

Зелёная морщинистость плодов яблони (*Apple green crinkle*). Симптомы наблюдаются только на плодах *Malus sylvestris*. Уже через три-четыре недели после цветения на завязи плодов появляются многочисленные вмятины. Мякоть в глубине их имеет тёмно-зелёную окраску и ненормальное строение сосудов. Кроме вмятин на плодах встречаются выпуклости вроде бородавок, покрытые грубым, шероховатым эпидермисом, под которым также расположены тёмно-зелёные ткани. Выпуклости и вмятины вызывают сильную деформацию, плоды остаются мелкими и не имеют товарной ценности. При заболевании зелёной морщинистостью распределение поражённых плодов в кроне дерева может быть различным. В одних случаях плоды с симптомами встречаются на отдельных ветвях, тогда как другие ветви выглядят здоровыми. В других случаях поражено множество плодов на всех ветвях дерева. Очевидно, это зависит от времени, прошедшего с момента заражения дерева, чувствительности сорта и агрессивности изолята вируса.

Зелёная морщинистость плодов яблони впервые описана в Новой Зеландии в 1946 году [51]. В настоящее время заболевание обнаружено в большинстве стран Европы, в Северной Америке и Австралии [105].

Н.Кegler и др. [99], работая с чистыми изолятами вируса ямчатости древесины яблони, получили симптомы зелёной морщинистости на плодах Кола крэб, при экспериментальном заражении их сильными изолятами названного вируса. При исследовании этиологии зелёной морщинистости и бурой кольцевой пятнистости плодов яблони сортов Первенец Самарканда, Саратони и Регистан [7] получены аналогичные результаты.

Данные позволили сделать вывод, что зелёную морщинистость плодов яблони вызывают сильные изоляты вируса ямчатости древесины. Присутствие комплекса других латентных вирусов яблони усиливает суровость проявления симптомов [99].

Вредоносность зелёной морщинистости велика, так как поражённые плоды полностью теряют товарную ценность.

Каменистость плодов груши и айвы (*Pear stony pit, Quince stony pit*). Первые симптомы на плодах груши (*Pyrus domestica*) и айвы (*Cydonia oblonga*) чувствительных сортов появляются уже через 10-20 дней после опадения лепестков, в виде тёмно-зелёных пятен под эпидермисом. Эти пятна часто расположены в форме колец. Рост мякоти плода в зоне пятен очень подавлен, а окружающие ткани развиваются нормально, поэтому плоды вскоре деформируются, покрываясь глубокой ямчатостью. Ткани в глубине ямок нередко некрозируются. Кроме того, в зоне поражённых участков образуются скопления механических клеток склеренхимы. Сильно поражённые плоды значительно меньше нормальных.

У маловосприимчивых сортов симптомы появляются в июле-августе и выражены значительно слабее. Обычно они выглядят как отдельные неглубокие вмятины или слегка углублённые в мякоть плода кольца. Скопления механических клеток и некрозы в мякоти незначительные, размер плодов, форма и вкусовые качества почти не ухудшаются. Поражённые плоды часто появляются на одной или нескольких ветвях дерева, в то время как другие ветви несут нормальные плоды. Симптомы вирусной каменистости могут возникнуть при недостатке бора или при повреждении плодов некоторыми насекомыми. Основное их отличие - передача вирусной каменистости прививкой. Визуально поражения, связанные с насекомыми, можно отличить по наличию укусов. При вирусном поражении на коже плодов повреждения отсутствуют. Впервые заболевание описано в 1913 году во Франции [13, 68].

Исследования, выполненные в ГДР, показали, что каменистость плодов и пожелтение жилок листьев груши вызывает один и тот же вирус ямчатости древесины яблони [13].

Ямчатость древесины косточковых пород. Симптомы ямчатости древесины были обнаружены и на косточковых, в частности на вишне, абрикосе, сливе и различных гибридных формах сливы, абрикоса, персика. Если сорт сливы Президент применяется как промежуточный между сортом Виктория и подвоем Миробалан Б, дерево становится карликовым и нездоровым [125]. Так, по данным Mosse В [126], сорта сливы Президент и Виктория, привитые на вегетативно размноженном подвое сливы Малинг Миробалан Б, усиливают деревья [88] и не проявляют симптомов несовместимости. Исследуя данные деревья, через 7 лет обнаружили, что при снятии коры с места спайки поверхность древесины Миробалана Б была покрыта неравномерными определенной формы ямками разной глубины и размера, главным образом расположенными в продольном направлении. Эти симптомы очень сходны с ямчатостью мексиканского лимона, описаной Wallace и Drake [155], которая связана с заражением вирусом, перенесённым с растений апельсина с симптомами тристецы. Это является причиной несовместимости привоя и подвоя у цитрусовых. Ямчатость на сливе была ограничена древесиной Миробалана Б ниже спайки и не распространялась на корни и выше на ствол сорта Президент. Ямчатость не встречалась ни на одном контрольном дереве с промежуточной вставкой сорта Виктория. Поперечные и продольные срезы были исследованы под микроскопом и показали, что ямчатость была связана с локализованным разрушением камбия на подвое [126].

Симптомы ямчатости древесины косточковых наблюдались на сеянцах персика после инокуляции различными изолятами вируса кольцевой пятнистости томатов. Болезнь передавалась через заражённую почву и экспериментально переносилась механической инокуляцией щитками коры. Вирус неравномерно распространялся по дереву, особенно, когда заражались пяти - семилетние деревья. Нет сведений о том, что штаммы вируса кольцевой пятнистости томатов косточковых передаются пылью персика или семенами. Вирус некротической кольцевой пятнистости косточковых, который был обнаружен в исследуемых образцах, может быть связан с ямчатостью деревьев персика, но не ответственен за симптомы ямчатости [146].

Smith [143] выделил вирусные изоляты из почвы, взятой в садах косточковых, где растения показывали большое количество симптомов ямчатости древесины. Почвенные пробы были взяты вокруг следующих деревьев: персик, нектарин, черешня и вишня. Пробы брали на 10-20 см ниже уровня почвы в пределах влажной поверхности вокруг внешне здоровых деревьев, больных деревьев или в зонах, где больные деревья были удалены. Почвенные пробы поместили в 8-дюймовые горшки, посеяли в них 6-15 растений огурца и содержали в теплице. В случае более сильных изолятов симптомы

появлялись на огурцах через 10-14 дней. Некоторые изоляты были идентифицированы как вирусы кольцевой пятнистости томатов и кольцевой пятнистости табака. Другие изоляты, были идентифицированы на основе круга растений-хозяев, физических свойств и серологических реакций.

По данным Smith S.H [143], изоляты вируса кольцевой пятнистости томатов и табака были получены из почвы вокруг деревьев персика и вишни с симптомами ямчатости. Эти изоляты, а также изолят вируса некротической кольцевой пятнистости косточковых были использованы для механического переноса на сеянцы персика Halford и Tennessee National. Растения проверяли на наличие симптомов через 13 месяцев. Пять из шести изолятов вируса кольцевой пятнистости томатов вызвали развитие ямчатости. Из 270 растений, заражённых вирусом кольцевой пятнистости томатов, процент растений с ямчатостью варьировал от 2,5% до 50%. Ямчатость не появилась ни на одном из 98 контрольных растений и ни на одном из 174 персиков, заражённых вирусом кольцевой пятнистости табака, или из 87 растений, заражённых 2 изолятами некротической кольцевой пятнистости.

Летом 1953 года Cameron H.R [63] столкнулся с проблемой отмирания пятилетнего сада итальянской сливы. Деревья увядали и проявляли вид окольцованных. Больные деревья были значительно меньше здоровых с незначительным ростом верхушек, при этом листья были бледно-зелёные, скручены внутрь и позднее желтели. Со временем деревья разрушались и погибали. Сильно заражённые деревья были слабо прикреплены в почве и имели разрушенную корневую систему. Диаметр ствола был меньше, а кора на уровне почвы была похожа на губку. После удаления коры вокруг места прививки была обнаружена глубокая ямчатость на побеге. Ямчатость приводила к спиралевидности камбия. Из 47,8% зараженных деревьев 32,2% погибли, а остальные 15,6% были серьёзно повреждены. Так как здоровые и больные деревья сливы на обоих участках имели одинаковый рост, вероятно, проблема не была связана с почвой или климатом. Симптомы навели автора на мысль о несовместимости, вызываемой вирусом, подобным вирусу тристецы цитрусовых. Попытки перенести вирус из итальянской сливы на другие растения сливы были неудачными. Симптомы ямчатости, наблюдаемые на растениях сливы итальянской в Орегоне, были похожи на симптомы, описанные в восточных садах персика. Это позволяет предположить, что возбудитель этой болезни может присутствовать в Орегоне.

Описывая ямчатость древесины на видах косточковых, кроме персика, [123, 69] приводят данные, что у каждого из видов пораженных деревьев наблюдается остановка

терминального роста и листовой хлороз в различной степени. У пораженных деревьев абрикоса может наблюдаться утолщение нижней части ствола. Часто на утолщениях коры имеются вытянутые трещины. Кора, покрывающая расширенную часть, губчатая, имеет утолщенные слои флоэмы и некротические участки. Ямки на древесном цилиндре пораженных деревьев короткие, но глубокие, с участками камбиального некроза. Они проявляются немного выше уровня почвы и на вершинах боковых корней. Плоды на пораженных деревьях созревают преждевременно, не достигают свойственного размера, слабо окрашены и могут преждевременно опадать. У поражённой сливы японской наблюдается сильное снижение терминального роста и поникший ростовой габитус по сравнению со здоровыми деревьями того же возраста. В нижней части ствола наблюдается толстая кора и ямчатость древесины, хотя степень зараженности зависит от сорта и от комбинации привой-подвой. Нижняя часть ствола европейской сливы также утолщена, хотя утолщение не так велико, как у персика и абрикоса. Кора толще, чем у здоровых сливовых деревьев, но различие не так сильно выражено. Кора пораженного ствола обычно имеет небольшие участки некрозов флоэмы. Древесный цилиндр нижней части ствола имеет глубокие борозды и некрозы сосудов камбия с бороздками. Ямчатость ствола может распространяться более, чем на 30 см над уровнем почвы. Вишневые деревья, пораженные этой болезнью, проявляют остановку терминального роста, хлоротичные, иногда скрученные листья и поникание терминальных побегов. Отмечено также сильное камедетечение ствола. Болезнь проявляется у сеянцев и у окулированных деревьев.

Ямчатость древесины персика была перенесена почками или щитками корней от естественно зараженных растений персика на сеянцы персика в поле и теплице [124]. Сеянцы абрикоса, привитые на подвое сеянцев Эльберты, зараженные почками от естественно зараженных растений персика, не были ямчатые, хотя подвой - персик не проявлял типичных симптомов. Естественная передача ямчатости древесины персика была выявлена в результате ежегодных обследований в густо посаженном саду сеянцев персика. Обычно наблюдалась передача болезни с больных растений на соседние, здоровые. Попытка передать вирус механически от естественно больных растений персика на различные травянистые индикаторы была неудачной.

В 1967 году [58] в некоторых североатлантических штатах США, Barrat, Mircetich наблюдали много персиковых деревьев с листовыми симптомами, характерными для окольцовывания. Известно, что подобные симптомы вызываются организмами корневого гниения, недостатком элементов питания, повреждением мышами,

сельскохозяйственными орудиями, гербицидами и холодом. При проверке большого числа поврежденных деревьев не обнаружили влияния ни одного из этих факторов. Однако, в связи с наличием опоясывания, поражённые деревья показывали характерные симптомы поражения в нижней части штамба. Они проявлялись в виде утолщения ствола на уровне или ниже почвы, сильного утолщения коры и ямчатости древесины. Деревья с подобными листовыми симптомами выявляли в течение нескольких лет. Связь ямчатости с листовыми симптомами ранее была замечена Barrat, Smith [57] и сообщена Barrat, Mircetich [56].

Летом 1967 года садоводы и ученые в североатлантических штатах обнаружили деревья персика, окрашенные странным образом. Новое заболевание - ямчатость древесины было ответственно за опоясывание, отмирание и гибель таких деревьев. Листовые симптомы развиваются поздним летом после уборки урожая, но раньше времени нормального листопада. Листья на пораженных деревьях чашевидной формы, жёлтые, позднее становятся красновато - пурпурными и преждевременно опадают. Растения в год заражения развивают листовые симптомы на одной или двух ветках, позднее всё растение проявляет симптомы. Сильно заражённые растения имеют подавленный и слабый рост. Их корневая система плохо развита. При выкапывании деревьев из почвы видны глубокие ямки в месте отрыва корней. Такие растения могут ломаться немного выше уровня почвы в результате сильных ветров. При этом выявляется дезорганизованная древесина на поперечном срезе. Если снять кору с древесины ниже уровня почвы, видны продолговатые ямки или извилины и выросты. Степень проявления симптомов ямчатости зависит от сорта, клона подвоя и стадии развития болезни. Jones, Stouffer полагали, что ямчатость древесины вызывается вирусом, но доказать это не могли. Несовместимость прививки также была маловероятна, так как не привитые сеянцы тоже были заражёнными. Кроме того, утолщение ствола и его ломкость не связаны специфически с местом прививки. Из пораженных деревьев не были изолированы бактерии, грибы и другие патогены. Видимая передача заболевания между отдельными садами предполагает наличие патогена. Почвенная передача предполагается, но прямых доказательств этого нет. Однако известно, что встречается передача через подвой в питомнике [93, 145].

Изучая различное проявление симптомов ямчатости древесины на различных естественно заражённых видах косточковых пород, Mircetich, Civerolo [122] наблюдали, что возбудитель ямчатости древесины легко переносился прививкой при перекрестном заражении различных видов косточковых. Симптомы ямчатости на зараженных

растениях-индикаторах были сходны с симптомами на подобных видах косточковых, зараженных естественно. Вероятно, ямчатость древесины на различных косточковых вызывается одними и теми же, или близкими штаммами одного и того же возбудителя. Вирус, выделенный из почвы в садах персика, нектарина и абрикоса с ямчатостью древесины серологически связан с вирусом кольцевой пятнистости томатов и двумя изолятами вируса жёлтой мозаики почек персика. Этот же вирус был выделен из абрикоса, европейской сливы и сеянцев китайской вишни, зараженных щитками корней от естественно зараженных деревьев абрикоса и персика. Однако авторы не нашли ни корреляции между присутствием этого вируса в почве и ямчатостью деревьев, ни устойчивой связи этого вируса с экспериментально зараженными индикаторами. Сеянцы абрикоса, высаженные рядом с естественно больными деревьями персика, развили симптомы через пять месяцев. Обычно все виды косточковых пород, пораженные ямчатостью, показывают отсутствие терминального роста, различной степени хлороз листьев, обесцвечивание, ямчатость и бороздчатость, связанные с выростами и нарушением структуры тканей ксилемы в нижней части ствола. Степень проявления симптомов обычно варьировала в зависимости от стадии болезни, вида и сорта растения.

Анализ возможности проявления симптомов ямчатости древесины на различных видах косточковых общим возбудителем, проведенный Stouffer, Levis [145], позволил установить сходство между симптомами ямчатости, описанными на персике, и симптомами, наблюдаемыми на других видах косточковых пород, и авторы предполагали, что возможность их взаимосвязи необходимо детально исследовать. Авторы считают, что один и тот же вирус или вирусы вызывают проявление симптомов ямчатости на других видах косточковых и что они распространяются каким-то естественным переносчиком в саду или питомнике. Межвидовые заражения будут сделаны для определения, могут ли вызываться симптомы на одном из видов косточковых при использовании инокулюма из разных видов косточковых.

Mircetich, Civerolo [122], описывая болезнь ямчатости древесины косточковых указывают на то, что у некоторых видов косточковых пород ямчатость древесины характеризуется утолщением коры, ямчатостью и бороздчатостью древесины и низким стволом. Болезнь вызывается агентом, переносимым прививкой. Некоторые штаммы, по крайней мере, одного вируса кольцевой пятнистости томатов, могут быть причиной ямчатости древесины. Хотя различные симптомы, вызываемые как одним агентом, так и штаммами близко с ним связанными, могут встречаться на различных естественно зараженных видах косточковых. Естественная передача возбудителя ямчатости древесины

в садах густо посаженного персика, абрикоса и сеянцев кислой вишни наблюдается обычно от больных деревьев на соседние здоровые деревья. Отдельные вирусы, включая кольцевую пятнистость томатов, многокомпонентный вариант некротической кольцевой пятнистости и, по крайней мере, один не идентифицированный нитевидный вирус, были изолированы из экспериментально заражённых растений с ямчатостью древесины. Кольцевая пятнистость табака и кольцевая пятнистость томатов могли быстро выделяться из почвы вокруг естественно заражённых деревьев. Однако только некоторые штаммы кольцевой пятнистости томатов могут быть замешаны в причинах ямчатости древесины. Изоляты кольцевой пятнистости томатов из косточковых пород с симптомами ямчатости древесины являются симптоматологически отличными от вируса жёлтой мозаики почек персика и от штаммов кольцевой пятнистости томатов на травянистых и древесных индикаторных растениях.

Ямчатость древесины на персике была найдена в одном из округов Иллинойса. Около 60% пятилетних деревьев были больны [147]. Подобное заболевание на сорте Рио-озо-Джем, выявленное в 1956 г, вероятно и было ямчатостью древесины. В саду округа Calhoun около 60% деревьев на плантации либо имели ямчатость древесины, либо были уничтожены, так как погибали, или имели ослабление роста, вероятно, из-за ямчатости древесины. Типичная ямчатость наблюдалась на корнях, коре, древесине и главных разветвлениях корней. Больные растения имели слегка подавленный рост, хлоротичные листья, окружённые различными повреждениями и болезнями. Эти симптомы были сходны с симптомами заболевания в других областях.

Возбудителями ямчатости древесины косточковых в США являются вирусы кольцевой пятнистости томатов [143] или кольцевой пятнистости табака [159], а переносчиком нематоды - *Xiphinema americanum* и *Xiphinema rivesi*.

По данным Вердеревской Т.Д. [13], заболевания ямчатости древесины косточковых описаны, у большинства косточковых пород, включая персик (*Prunus persica*.L.), абрикос (*Prunus armeniaca*. L.), сливу (*Prunus domestica*. L.), черешню (*Prunus avium*. L.), вишню (*Prunus cerasus*. L.), алычу (*Prunus cerasifera*. Ehrh.), мирабель (*Prunus myrobalan*. L.), антипку (*Prunus mahaleb*. L.), *P.davidiana* Franch, *P.gondounii*. Rehder, *P.insitita*. L, *P.salicina*. Lindl, *P.serulata*. Lindl, и у их гибридов. Изолирование вируса из поражённых деревьев и перенос его на травянистые тест-растения сложны и недостаточно надёжны. В опытах по изучению этиологии ямчатости древесины косточковых ряд изолятов был перенесён прививкой на вишню сорта Шатенмортель, черешню сорта Маззард и на индикаторы яблони *Malus platycarpa* и *Virginia crab*. В свою очередь, симптомы ямчатости

древесины на сорте Маззард получены при инфицировании её изолятами ямчатости и бороздчатости древесины яблони [7, 151]. Полученные авторами результаты говорят о том, что некоторые изоляты ямчатости древесины яблони способны вызвать ямчатость древесины на косточковых породах и наоборот.

Долгое время карельская береза (*Betula pendula* var. *carelica*, Merckl) считалась дендрологической формой генетического происхождения. Начиная с 1922 года, появляется гипотеза, что текстура карельской березы образуется в результате болезни. По внешним признакам состояние древесины карельской березы напоминает вирусную ямчатость древесины плодовых. По Атанасову [50], изменения древесины карельской берёзы образуются в результате вирусной ямчатости древесины. Свою гипотезу автор высказал на основании сходства морфологических признаков болезни берёзы и вирусной ямчатости плодовых: яблони, груши, сливы, вишни, и др. [24]. Сравнивая анатомическое строение древесины карельской березы и яблони *Virginia crab* зараженной вирусной ямчатостью древесины, пришли к выводу, что одно из характерных свойств инфицированной яблони *Virginia crab* и карельской берёзы состоит в том, что под корой на стволе видны разной величины и формы бороздки и впадинки. Соответственно этим впадинкам в коре образуются выступы, которые заполняют их. Характерно, что флоэмная ткань, образующая выросты, очень утолщена. Флоэмные лучи как больной яблони, так и карельской березы дезорганизованы и шире чем, у здоровой яблони и березы. На основании проведенных опытов авторы предположили, что болезнь ямчатости древесины яблони и болезнь карельской березы вызывает один и тот же, или родственный возбудитель. По данным того же Петерсона Л. [25], при обследовании плодовых насаждений БССР методом визуальной оценки выявили черешню с типичными морфологическими признаками болезни ямчатости древесины плодовых. По своему внешнему виду она полностью напоминает карельскую березу. Самым ярким отличительным морфологическим признаком карельской березы от ямчатости древесины плодовых является наличие вздутий, узелков и утолщений на поверхности ствола, часто переходящих на скелетные ветки. Кора, особенно у основания ствола, темнее, с продольными трещинами и толще. Больные деревья раньше отмирают, прирост очень незначительный, крона несимметрична, имеет раскидистый габитус.

1.2. Диагностика исследуемого вируса биологическими методами

Вирус ямчатости древесины яблони впервые описан по реакции дикой формы яблони *Virginia crab* [144]. Этот вид стал первым индикатором на вирус ямчатости древесины яблони, а перенос на него вируса ЯДЯ прививкой - первым методом его диагностики. На

Virginia crab симптомы проявляются в виде многочисленных продольных борозд на древесине, видимых при снятии коры. Отмечено также образование многочисленных отпрысков и постепенное отмирание деревьев [149], а также поражение плодов *Virginia crab* [156, 132]. Кроме *Virginia crab* к вирусу ямчатости древесины восприимчивы и некоторые другие крбовые яблони [156], а также *Malus floribunda*, Siedold [65]. Некоторые сорта яблони, такие как Рэд Делишес, Спартан, Мекинтош, привитые на *Virginia crab*, могут проявлять лёгкие симптомы поражения [57]. Трифонов Д. [45] отметил сильное подавление роста *Malus platycarpa*, Rehder под влиянием вируса ямчатости и слабые симптомы на сортах: Красное превосходное, Пармен зимний золотой, Золотое превосходное, Старкримсон и подвоях ЕМ-VII; ЕМ-IX; ЕМ-XI. На SPY-227 ВЯДЯ вызывает отмирание индикатора [82].

Начиная с 1986 года, когда изолят ВЯДЯ был перенесён на травянистые индикаторы *Nicotiana occidentalis* 37B и *Chenopodium murale* [79], стал применяться метод диагностики вируса ЯДЯ на травянистом индикаторе при механическом инфицировании соком зараженных плодовых растений. Метод травянистых индикаторов применяется как предварительный тест в системе получения безвирусного посадочного материала и в настоящее время. Он прост, не требует специального оборудования, но имеет ряд существенных недостатков, которые сильно ограничивают его применение. Одним из таких недостатков метода является его зависимость от погодных условий. При высоких температурах проявление характерных симптомов резко уменьшается, и результаты становятся плохо воспроизводимыми. Поэтому метод травянистых индикаторов обычно применяется только весной, а лучшим материалом для приготовления инокулюма являются бутоны, лепестки и молодой прирост.

Несмотря на отмеченные недостатки, метод травянистых индикаторов был важным этапом в развитии диагностики вирусных заболеваний плодовых культур. Переносом вирусов на травянистые индикаторы был решён вопрос об их очистке, концентрировании и получении диагностических антисывороток.

Трудности очистки вирусов непосредственно из плодовых растений связаны с особенностями состава сока и тканей этих культур. Обилие полифенолов, большая активность энзимов и высокая кислотность сока инактивируют вирусы в момент растирания плодовых тканей. Преимущество использования травянистых растений как источника для очистки вирусов проявляется в том, что в их тканях вирусы накапливаются в больших количествах, а окислительные процессы протекают менее интенсивно, чем в тканях древесных пород.

Разработка метода очистки ВЯДЯ проводилась в 90-е годы прошлого столетия. В 1986 году ВЯДЯ был впервые перенесён на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37В [79]. В 1990 году вирус ВЯДЯ был накоплен и очищен из тканей *Nicotiana occidentalis* 37В [103]. Затем, в целях получения высококачественной поликлональной диагностической сыворотки, методы очистки усовершенствовали различные авторы [19, 95, 103].

1.3. Диагностика ВЯДЯ иммунологическими и молекулярно-генетическими методами

Иммуноферментный анализ (ИФА). В конце 60-х годов 20-го столетия для диагностики фитопатогенных вирусов был разработан латекс-тест. Суть этого метода состоит в том, что перед реакцией с антигеном антитела адсорбируют на нерастворимых частицах латекса [160]. Использование латексов значительно повысило порог чувствительности серологических методов и позволило диагностировать фитовирусы в тканях зараженных индикаторов и лепестках яблони.

Принцип ИФА, описанный впервые Engvall E. и Perlmann P. [77], основан на последовательном взаимодействии исследуемого вируса с сорбированными на твёрдой фазе антителами, меченными ферментом, с последующим выявлением фермента-маркера в реакции с субстратом. Увеличение оптической плотности продукта ферментативной реакции пропорционально концентрации вируса.

В 1974 году был предложен новый серологический метод иммуноферментного анализа: ИФА – ELISA - тест (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), основанный на маркировке антител ферментами. Метод впервые был использован для вируса табачной мозаики в 1976 году. Затем была изучена возможность применения данного метода для диагностики вирусов плодовых культур [71]. В дальнейшем метод неоднократно модифицировался и в настоящее время широко применяется во всём мире для диагностики сокопереносимых вирусов плодовых.

Иммуноферментный анализ имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с другими серологическими методами. Наиболее значительным является его высокая чувствительность. Методом ИФА можно диагностировать фитопатогенные вирусы, концентрация которых в поражённых тканях превышает 1 нг [136].

Высокая чувствительность метода ИФА открывает возможности его применения для диагностики сокопереносимых вирусов яблони, и в частности ВЯДЯ, в различных тканях плодовых растений.

Метод иммуносорбентной электронной микроскопии (ИСЭМ). Постоянное совершенствование электронных микроскопов и методов приготовления препаратов

позволило применить электронную микроскопию для выявления вирусов плодовых культур.

В 40 годах прошлого столетия [48] с помощью электронного микроскопа начали изучение серологических реакций, тем самым заложив основу сочетания двух методов. В 1968 году [53] предложено комбинирование метода погружения, ранее разработанного [62] для электронной микроскопии с серологическими методами диагностики.

Идея применения иммунологических методов в электронной микроскопии была развита Derrick K.S. [73, 74]. Разработанный им метод заключается в том, что перед нанесением растительного экстракта на предметные сетки их поверхность покрывают антителами к исследуемому вирусу. Благодаря специфической реакции, протекающей в процессе инкубации между антителом и антигеном, вирусные частицы прилипают к поверхности плёнки, что приводит к значительному увеличению их количества в препарате. Эта методика, известная в литературе как «метод Деррика», в дальнейшем неоднократно была модифицирована [119]. Milne R.G., Luisoni E. [119] предложили вылавливаемые на плёнке частицы обработать антисывороткой с последующей промывкой и контрастированием водным раствором уранилацетата. В результате вирусные частицы легко выявляются за счёт увеличения их объёма.

В настоящее время метод успешно применяется не только для диагностики фитопатогенных вирусов, но и для идентификации вирусных штаммов [100]. При помощи этого метода можно обнаружить фитопатогенные вирусы в концентрации до 0,1 нг [136].

Метод был предложен для диагностики ВЯДЯ в яблоне. Существенным недостатком метода явилось то, что время применения было ограничено цветением деревьев. В экспериментах из лепестков поражённых деревьев удалось выявить вирус ямчатости древесины яблони [95].

Метод полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). В 1983 году американский учёный Кэри Мюллис [127] изобрёл метод ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний, являющийся одним из самых точных и чувствительных методов диагностики.

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) - экспериментальный метод молекулярной биологии. В основе метода лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате нарабатывается достаточное количество ДНК, необходимое для визуального определения. При этом происходит копирование только того участка, который соответствует заданным условиям, и только в случае, если он присутствует в исследуемом образце. Этим методом проводят диагностику вирусных инфекций. Чувствительность метода значительно превосходит

такую у иммунологических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью. Специфичность ПЦР для всех вирусных, микоплазменных и большинства бактериальных инфекций достигает 100%. Применение ПЦР - диагностики очень эффективно в отношении возбудителей и внутриклеточных паразитов. Методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от инфицированного объекта, но и в материале, получаемом из внешней среды (вода, почва и др.). Специфичность ПЦР основана на образовании комплиментарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18-30 нуклеотидов. Каждый из праймеров комплиментарен к одной из цепей двухцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицированного участка.

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- ДНК - матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплиментарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК - полимераза;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (A,G,C,T);
- ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор.

ПЦР проводят в амплификаторе – приборе, обеспечивающим периодическое охлаждение и нагревание пробирок с точностью не менее $0,1^{\circ}C$. Чтобы избежать испарения, к реакционной смеси в пробирку добавляют вазелиновое масло.

При проведении ПЦР выполняется 25-30 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий. Двухцепочечную ДНК - матрицу нагревают до $94-96^{\circ}C$, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, при данных температурах разрушаются водородные связи между двумя цепями. После того как цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на $4-5^{\circ}C$ ниже их температуры плавления. ДНК - полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это - стадия элонгации. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы наиболее активны при $72^{\circ}C$. 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 одноцепочечные

фрагменты. Эта стадия длится 10-15 минут [15]. Визуализацию результатов ПЦР проводят с применением метода гель-электрофореза. Визуализацию результатов гель-электрофореза проводят в ультрафиолетовом спектре излучения.

1.4. Выводы к главе 1

В результате анализа состояния изученности ВЯДЯ можно сделать следующее выводы:

1. Вирус ямчатости древесины яблони поражает яблоню (*Malus sylvestris* L) и 18 диких видов (*Malus*), грушу (*Pyrus domestica* L) и 16 диких видов, айву (*Cydonia oblonga* Mill, *Pyronia veitchii* Mill).
2. ВЯДЯ распространён почти во всех странах, где возделывают семечковые породы. В Республике Молдова распространение вируса ямчатости древесины яблони составляет 14,1%, а в комплексе с другими латентными вирусами яблони ВЯДЯ снижает урожайность на 22-25%.
3. ВЯДЯ не передаётся семенами, а распространяется с использованием заражённого материала для размножения.
4. ВЯДЯ принадлежит к роду *Foveavirus*, семейства *Betaflexyviridae*, порядку *Tymovirales*, вирионы нитевидные, не имеют суперкапсидной оболочки. Модальная длина составляет 800х12-15 нм, вирионы ВЯДЯ способны агрегировать конец в конец, образуя морфологические структуры в инфицированных клетках, что приводит к цитоплазматическим изменениям в клетке.
5. Методами ПЦР и анализа филогенетического родства изолятов ВЯДЯ установлено, что заболевания яблони, груши и айвы: ямчатость древесины яблони, отмирание-SPY-227, пожелтение жилок груши и красная пятнистость, сажистая кольцевая пятнистость айвы, каменистость плодов груши и айвы, зелёная морщинистость плодов яблони вызываются вирусом ямчатости древесины яблони.
6. Для обнаружения ВЯДЯ используют древесные индикаторы *Virginia crab* и SPY-227, на которых наблюдают видимые симптомы поражения, а травянистым индикатором для переноса и накопления ВЯДЯ является *Nicotiana occidentalis* 37В.
7. Диагностику вируса ямчатости древесины яблони рекомендовано проводить, лабораторными ИФА, ИСЭМ, ОТ-ПЦР и полевыми методами.

По результатам анализа состояния изученности перед нами была поставлена **цель** исследований: усовершенствование и оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони и применение их в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур в соответствии с европейскими стандартами

сертификации. Для достижения цели необходимо было решить следующие **задачи**: выявить и идентифицировать вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони, определить реакцию на перенос вируса ямчатости древесины яблони на травянистые индикаторы, оптимизировать методику очистки вируса ямчатости древесины яблони, разработать диагностическую антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони, усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони, внедрить оптимизированные методы диагностики в систему сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная работа проводилась с 2003 по 2016 г.г. на базе лаборатории вирусологии Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий, на кафедре вирусологии Киевского национального университета им. Т.Шевченко и в лаборатории вирусологии института садоводства Украины. В проведённых исследованиях для достижения поставленной цели было задействовано имеющееся в лабораториях современное оборудование и химические реактивы, а также тепличный комплекс и питомник тестирования в полевых условиях Лаборатории вирусологии Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий, Кишинёв, Республика Молдова.

2.1. Материалы исследований

Материалом наших исследований служили:

- изоляты вируса ямчатости древесины яблони, выделенные из следующих сортов яблони: Nowamac (3/53/20), Remura (1/17/63), Alie parusa (3/38/63), LisGolden (3/50/37), B3b18,13 (3/52/42), Spur Iord Derby (3/38/80), Naslednita (3/37/80), Priam (2/22/22), Royal Gala (3/32/11), OR33T90x Alkmene (1/15/13), Slava Peremojtm (1/9/63) и изоляты из трёх сортов груши (№2, №3, №4) из селекционно-коллекционного сада Научно-Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий.
- Изоляты вируса ямчатости древесины яблони 10/21, G-12 из коллекции института Плодоводства, г. Киев (Украина);
- изоляты вируса ямчатости древесины яблони SP-3, VC-7 из коллекции института Плодоводства, г. Прага (Чехия);
- антисыворотки к вирусу ямчатости древесины яблони, любезно предоставленные доктором Янасе (Япония) с титром 1:2000 и полученные ранее в лаборатории вирусологии с титром 1:2000;
- стандартные международные древесные индикаторы: *Virginia crab*, SPY-227, R-12740/7A и *Malus coronaria Morton*;
- травянистые индикаторы для накопления вируса ямчатости древесины яблони *Nicotiana occidentalis 37B*, *Cucumis sativus*;
- кит, для выделения тотальной РНК коммерческой фирмы (Qiagen, Great Britain);
- кит, для проведения ОТ-ПЦР реакции коммерческой фирмы (Invitrogen, USA).

2.2. Методы исследований

2.2.1. Метод выявления и переноса ВЯДЯ на древесные и травянистые индикаторы

Выявление изолята ВЯДЯ проводили методом иммуносорбентной электронной микроскопии [120]. Для этого в коллекционно-селекционных садах яблони и груши Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий отбирали образцы естественно распустившихся генеративных и вегетативных почек.

Отбор проводили с двух или трех деревьев каждого сорта. Отобранные образцы этикетировали и помещали в переносную холодильную камеру.

Препараты для иммуносорбентной электронной микроскопии готовили на палладированных сетках (30 линий/мм), предварительно покрытых коллодиевой пленкой и укрепленных углём.

Для сенсibilизации предметных сеток использовали имеющиеся в распоряжении антисыворотки из Японии и приготовленные в нашей лаборатории, которые разводили 0,02-0,05М К/Na-фосфатным буфером pH-7,2-7,4 до значений 1:100, 1:150, 1:200. Затем активированные сетки помещали на каплю сырого сока отобранных образцов. После промывки предметные сетки обрабатывали антисыворотками соответствующего разбавления, промывали дистиллированной водой и контрастировали 2-3% - водным раствором уранилацетата.

Критерием отбора проб являлось количество выловленных антителами вирусных частиц в поле препарата при его сканировании в электронном микроскопе.

Отобранные изоляты использовались в дальнейших исследованиях для переноса на древесные и травянистые индикаторные растения.

Индикаторы - это сорта и дикie виды, обладающие чувствительностью к определённым вирусам. В наших исследованиях мы использовали древесные индикаторы *Virginia crab*, *SPY-227*, *R-12740/7A* и *Malus coronaria Morton*, рекомендованные Европейским комитетом по кооперации исследований вирусных заболеваний плодовых культур. Заражение проводили вприклад «щитком», то есть передачу инфекции проводили путём заражения индикаторов кусочком коры от испытуемого дерева. Для этих же целей, кроме заражения «щитком», был использован основной тест методом двойной окулировки. Суть основного метода двойной окулировки заключается в том, что на высаженный весной сеянец в конце июля - августа окулируют глазок индикатора, а ниже на четыре-пять сантиметров - глазок исследуемого дерева. Следующей весной нижний глазок после прорастания прищипывают, однако, если в нём присутствовал вирус, то он проникает в верхний развивающийся побег индикатора и вызывает на нём

соответствующие симптомы заражения. Деревья индикатора были высажены в открытый грунт, и за ними проводился надлежащий уход. Наблюдения за индикаторами проводились в течение четырёх лет.

Механический перенос ВЯДЯ с яблони на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis 37B* проводили в теплице в марте-июне и сентябре-октябре с использованием коры годичного прироста и искусственно пробуждённых почек и лепестков. В июле-августе и ноябре-январе опыты по переносу прекращали, так как высокие летние температуры подавляли репродукцию вирусов, а недостаток освещения зимой плохо отражался на растениях индикатора. Первичные переносы вируса с плодовых на травянистый индикатор проводили с использованием коры годичного прироста, распутившихся почек и лепестков цветков.

Изоляты ВЯДЯ размножали на травянистом индикаторе *Nicotiana occidentalis 37B*. Растения индикатора выращивали в ящиках на торфяном субстрате TS-3.

Инокулюм для заражения готовили с использованием 0,05М К/Na-фосфатного буфера pH-7,6-7,8 с добавлением 0,01% аскорбиновой кислоты; 0,01% сульфита натрия; 0,01% тиоглицерола.

Растения заражали в стадии 4-5 листьев. Перед заражением листья травянистых индикаторов опудривали карборундом для образования ран в эпидермисе листа и 24 часа выдерживали в тёмной прохладной комнате. После появления симптомов вируса ямчатости древесины яблони на листьях индикатора *Nicotiana occidentalis 37B* проводили пассажи (заражение индикатора *Nicotiana occidentalis 37B* инокулюмом, приготовленным из заражённых листьев, с симптомами вируса). Пассажи проводили с целью освобождения от побочных вирусов, хлоротической пятнистости листьев яблони и бороздчатости древесины яблони (в случае наличия таковых) и накопления большого количества вируса в листьях растения-индикатора. Пассажи осуществляли, используя буферную смесь 0,01М К/Na-фосфатный буфер с добавкой 0,01% аскорбиновой кислоты; 0,01% сульфита натрия; 1%-поливинилпирролидона (PVP-25). Соотношение инокулюма к экстрактивной смеси 1:2 - 1:4.

Изоляты, которые легко переносились и пассировались на индикаторные растения *Nicotiana occidentalis 37B*, использовались в дальнейших исследованиях по оптимизации метода очистки молдавских изолятов ВЯДЯ.

2.2.2. Метод получения очищенных вирусных препаратов, иммунизации кроликов и определения качества антисывороток

Приступая к исследованиям по очистке молдавского изолята вируса ямчатости древесины яблони, мы изучили разработанную японскими исследователями методику очистки вируса ЯДЯ [103] и методику очистки другого удлинённого вируса с приближенными морфологическими параметрами, предложенную голландским исследователем [87].

Метод очистки ВЯДЯ по Yanase [103] состоит в том, что экстракт из листьев *Nicotiana occidentalis* 37B освещают гелем, состоящим из фосфата натрия и хлористого кальция, с последующим низкоскоростным центрифугированием и ультраскоростным центрифугированием на 20 % сахарозной подушке.

J.van. Oosten [87] при разработке очистки вируса шарки для осветления растительного экстракта применил TRITON X-100. После удаления грубых растительных остатков низкоскоростным центрифугированием в растительный экстракт добавляли по капле, при постоянном перемешивании 3-5% TRITON X-100, который в течение 30 мин при температуре +4⁰С приводил к растворению клеточных компонентов [47]. При дальнейшем ультрацентрифугировании при 90000g в течение 90 мин осаждались только вирусные частицы и грубые растительные остатки. Ресуспендированный осадок после ультрацентрифугирования центрифугировали при 5000g в течение 10 мин для удаления примеси. Низкоскоростное центрифугирование проводили в центрифуге BECKMAN J2-21M USA. Ультрацентрифугирование проводили в центрифуге BECKMAN L8-70M USA с применением роторов к данным центрифугам.

Оптимизируя методику очистки молдавского изолята, мы испытали оба метода, однако остановились на методике, при которой осветление проводили TRITON X-100. Остальную процедуру очистки выполняли по схеме, предложенной японскими исследователями [103]. Процедура очистки повторялась для выделенных вирусных изолятов.

Степень чистоты и концентрацию вируса в препарате, а также возможное агрегирование вирусных частиц в процессе очистки, контролировали в спектрофотометре SPEKOL-1500 (Analytic Jena, Германия) в диапазоне волн 220-320нм и методом иммуносорбентной электронной микроскопии. Визуализацию результатов проводили в электронном микроскопе TESLA BS – 500 (Чехословакия) при увеличении в 18000 раз.

Для приготовления антисыворотки к вирусу ямчатости древесины яблони нами использовались кролики породы «Белый великан» весом 2500-3000г и более. Молодые

кролики, имеющие меньший вес, вырабатывают меньше антител. Важно, чтобы у кроликов были большие уши с хорошо заметными венами. Каждое животное содержалось в отдельной клетке. Одним из важных условий содержания животных считается их кормление. Корма не должны содержать гормонов и антибиотиков, поскольку даже небольшое их количество в пище может исказить результаты эксперимента.

Иммунизацию животных проводили очищенным препаратом ВЯДЯ в концентрации 200-300мкг/мл. Доза вводимого препарата составляла от 0,7 до 1,0 мл вирусной суспензии. Для получения антисыворотки была использована короткая схема иммунизации, состоящая из трёх инъекций: подкожной, внутримышечной и внутривенной, с интервалом в 7 дней между ними. Первая инъекция - подкожная - была сделана с полным адъювантом Фрейнда. Вторая - внутримышечная инъекция - с неполным адъювантом Фрейнда, а последняя - внутривенная инъекция - проводилась чистым препаратом вируса. Через неделю после последней инъекции у животных брали кровь для определения активности (титра) вырабатываемых ими антител. Титр полученной антисыворотки устанавливали методом иммуносорбентной электронной микроскопии [120], используя в качестве инфекционного материала сок зараженных растений *Nicotiana occidentalis* 37B. На 62 день от начала иммунизации подопытные животные были реиммунизированы двумя инъекциями с недельным интервалом.

Кровь у кроликов отбирали из ушной вены перед каждой инъекцией, а затем один раз в неделю в течение 1-1,5 месяцев. Кролика помещали в специальный ящик, которым пользовались и при внутривенном введении антигена. Шерсть на участке, где проходит ушная артерия, выстригали. Кусочком ваты, смоченным толуолом или ксилолом, это место натирали для расширения вены. На вене делали разрез длиной 3-5мм по ходу сосуда лезвием безопасной бритвы. Кровь собирали в пробирки. У взрослого животного можно разово взять 40-80мл крови. После забора достаточного количества крови кровотечение останавливали, слегка нажав на разрезанную вену кусочком ваты, до полного сворачивания крови. Затем ухо промывали физиологическим раствором и дезинфицировали этанолом, чтобы избежать некроза тканей. Поочередно использовали правое и левое ухо. Собранную кровь для свёртывания оставляли на несколько часов при комнатной температуре. После окончания ретракции прозрачную желтоватую жидкость осторожно отделяли - это и является антисывороткой.

Полученные антисыворотки помещали в холодильник на 24-48 часов, хранили в низкотемпературном холодильнике при -18⁰С в маленьких ёмкостях по 15-20 мл сыворотки (для удобства хранения и быстрой разморозки при необходимости).

Титр полученных антисывороток устанавливали методом иммуносорбентной электронной микроскопии [120], используя в качестве инфекционного материала отрастающие листья индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B, системно инфицированные ВЯДЯ.

2.2.3. Иммунологические и молекулярно-генетические методы

Метод иммуноферментного анализа (ИФА). Для постановки иммуноферментного анализа фракцию иммуноглобулинов IgG выделяли методом аффинной хроматографии. В качестве сорбента использовали комплекс протеин А сефароза CL- 4B, «SERVA» USA [72].

Конъюгат (комплекс иммуноглобулинов с ферментом) получали по методу, описанному Clark M.F, Adams A.N в 1977 году [70], используя в качестве фермента щелочную фосфатазу активностью 10000KU, «SIGMA» USA. Лиофилизированную фосфатазу разводили буферным раствором и добавляли к ней иммуноглобулины. Всё вносили в диализный мешок и 24 часа проводили диализ против PBS. После диализа добавляли 1% глютаровый альдегид [52] до конечной концентрации 0,06%, с последующим инкубированием смеси при комнатной температуре в течение 4-х часов. Далее повторно 24 часа проводили диализ против PBS. После диализа для консервирования добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) и азид натрия.

Анализ проводили на микроплатах ‘Linbro’ фирмы ‘Flow’ в соответствии с «сэндвич» вариантом ИФА [70].

Гамма-глобулиновую фракцию IgG, разведеную в карбонатном буфере (pH-9,6), наносили на плашку и выдерживали в течение 4-х часов при +37⁰С или в течение 12 часов при температуре +4⁰С. Плашки отмывали 4 раза по 3 мин PBS-TWEEN буфером (pH-7,4).

Образцы для анализа растительные экстракты готовили следующим образом: 1г растительной ткани растирали в фарфоровой ступке в 0,01М фосфатным буфером pH-7,6-7,8, содержащим 0,1% - сульфата Na, 0,1% - аскорбиновой кислоты, 1%-поливинилпирролидона (PVP) в соотношении 1:10. Экстракты осветляли в течение 20 минут центрифугированием при 3500 об/мин. Затем осветленный экстракт по 200 мкл вносили в лунки микроплат и инкубировали в течение 18 часов при +4⁰С. Отмывку проводили 5 раз по 3 минуты, а затем наносили конъюгат и инкубировали 4 часа при температуре +37⁰С. После отмывки микроплат в лунки наносили субстрат 4-нитрофенил-фосфат Na «SERVA» USA в 10% растворе диэтаноламина pH-9,8. Через 30 мин измеряли

оптическую плотность продукта ферментативной реакции при длине волны 405 нм на фотометре «Sanofi PR2100» USA.

Для оптимизации условий проведения ИФА ВЯДЯ изучали различные концентрации иммуноглобулинов и разведения конъюгатов. Для сенсibilизации микроплат использовали иммуноглобулины в концентрации 0,5; 0,75; 1,0 мкг. Адсорбцию проводили в течение 12 часов при +4⁰С. В связи с изменением объёма и возможными потерями иммуноглобулинов, во время диализа в процессе приготовления конъюгата его применяли не в абсолютной концентрации, а в разведении 1:500, 1:750, 1:1000.

Определение оптимальных условий реакции проводили с использованием очищенного препарата ВЯДЯ, сырого сока зараженного индикатора *Nicotiana occidentalis* 37В и заражённых деревьев яблони, груши и айвы.

При разработке проведения ИФА было изучено влияние различных эстрагирующих буферов на результаты реакции.

Отбор средней пробы для массового тестирования ВЯДЯ отрабатывали отбором побегов с верхнего, среднего и нижнего ярусов как внутри кроны, так и с наружной части дерева.

Для определения динамики накопления вируса ЯДЯ в течение года выбирали по 10 модельных деревьев каждой породы и регулярно (раз в месяц) их тестировали.

Для оптимизации временных параметров проведения ИФА был опробован и отработан вариант ИФА, в котором инкубацию растительного сока проводили совместно с конъюгатом в различных разведениях. Для этого плашки сенсibilизировали гамма-глобулиновой фракцией IgG, разведенной в карбонатном буфере pH-9,6 и выдерживали в течение 4-х часов при +37⁰С или в течение 12 часов при температуре +4⁰С. Плашки отмывали 4 раза по 3 мин PBS-TWEEN буфером pH-7,4. Экстракты осветляли центрифугированием при 3500 об/мин 20 мин. Затем осветленный сок по 100 мкл вносили в лунки микроплат и в эти же лунки по 100мкл вносили конъюгат, сорбировали в течение 18 часов при +4⁰С. Отмывку проводили 5 раз по 3 мин. После отмывки микроплат в лунки вносили субстрат 4-нитрофенилфосфат Na фирмы «SERVA» USA в 10% растворе диэтаноламина pH-9,8. Через 30 мин измеряли оптическую плотность продукта ферментативной реакции при длине волны 405 нм на фотометре «Sanofi PR2100» USA.

Непрямой ИФА проводили по методу Engvall [77]. Для этого 0,2 мкл раствора протеина А фирмы «SERVA» USA наносили на плашку и инкубировали 16 часов при температуре +4⁰С. После отмывки на плашки наносили антисыворотку в разведении 1:1000-1:4000 и инкубировали 2 часа при +30⁰С. На отмытую плашку наносили антиген и

выдерживали в течение ночи при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. После инкубирования антигена плашки отмывали и вторично наносили разведённую в тех же пропорциях антисыворотку. Конъюгат (щелочная фосфатаза с протеином А) наносили в разведениях 1:1000-1:4000 и инкубировали 3 часа при $+30^{\circ}\text{C}$. После отмычки наносили субстрат и через 60 мин снимали показания экстинкции при длине волны 405 нм на фотометре «Sanofi PR2100» USA.

Метод иммуносорбентной электронной микроскопии (ИСЭМ). Иммуносорбентная электронная микроскопия основана на принципах описанного выше метода иммуноферментного анализа, но отличается тем, что результаты иммунологической реакции антиген-антитело выявляются при сканировании препаратов в электронном микроскопе.

В практике для выявления вирусов, поражающих плодовые культуры, наиболее часто используют метод специфического вылавливания частиц по [74] с последующим декорированием выловленных частиц специфическими антителами по [120].

Для идентификации ВЯДЯ методом ИСЭМ мы использовали следующие этапы приготовления препаратов: предметные сетки покрывали коллодиевой плёнкой. Поверхность плёнки укрепляли углём путём его испарения в вакууме. Готовые предметные сетки с коллодиево-угольной плёнкой сенсibilизировали предварительно разведенной буферным раствором специфической антисывороткой при комнатной температуре. После сенсibilизации предметные сетки промывали буферным раствором.

Ткани исследуемого образца гомогенизировали в фарфоровой ступке. Полученную мезгу центрифугировали в низкоскоростной центрифуге для удаления грубых растительных тканей. Сетки инкубировали на поверхности осветлённого сырого сока растения при комнатной температуре. После инкубации препараты промывали раствором буфера и выдерживали на капле антисыворотки того же разведения в течение 60 минут при комнатной температуре или 2-3 часа при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в холодильнике. Затем препараты промывали дистиллированной водой и контрастировали 2-3% водным раствором уранилацетата.

Визуализацию и фотографирование препаратов осуществляли в электронном микроскопе TESLA BS-500 (Чехословакия) при ускоряющем напряжении 90 KV и увеличении 14000 раз.

Напыление сеток углеродной плёнкой проводили в вакуумном напылителе ВУП-4 (СССР).

Метод полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

Для постановки ОТ-ПЦР использовали наборы для выделения тотальной РНК RNeasy Plant Mini kit фирмы Qiagen, (Великобритания) [134] и кит для проведения ОТ-ПЦР реакции Super Script III One Step RT-PCR фирмы Invitrogen (USA).

Выделение тотальной РНК проводили по рекомендации фирмы - производителя, следующими этапами:

- 100 мг образца гомогенизировали в ступке и переносили в стерильный эппендорф;
- добавляли 500мкл RLT буфера и 5 мкл меркаптоэтанола и инкубировали 2 мин на водяной бане при +56⁰С. Основным компонентом RLT буфера является гуанидин тиоцианат;
- полученный гомогенат центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин;
- надосадочную жидкость переносили в пробирку объёмом 2мл и добавляли 220 мкл этанола (96-100%);
- 650 мкл переносили в RNeasy mini колонку и центрифугировали 15 сек при 10000 об/мин;
- добавляли 700 мкл RW1 буфера в колонку, и центрифугировали, 15 сек 10000 об/мин (основным компонентом буфера RW1 является спирт этанол);
- переносили колонку в новую 2мл пробирку и добавляли 500 мкл RPE буфера, центрифугировали 15 сек – 10000 об/мин;
- добавляли 500 мкл RPE буфера в колонку и центрифугировали 13000 об/мин – 1мин;
- колонку переносили в новую 1,5мл пробирку, добавляли 35 мкл стерильной воды и центрифугировали 10000 об/мин -1 мин;
- колонку утилизировали, в эппендорфе оставалась РНК.

Все этапы центрифугирования проводили при температуре +20+24⁰С согласно протоколу.

Анализ проводили с применением набора Super Script III One Step RT-PCR фирмы Invitrogen (SUA), готовили RT-PCR смесь согласно протоколу:

2XReaction Mix - 25μL;

Template RNA (0,01pg-1pg) –x μL;

Sense primer (10μM) – 1μL;

Antisense primer (10μM) – 1μL;

Super Script III RT/Platinum Tag Mix – 2μL;

Стерильная дистиллированная вода-до 50μL.

Приготовленную RT-PCR смесь помещали в эппендорф, куда вносили и тестируемые образцы. Перед началом амплификации проводили обратную транскрипцию (перевод РНК в ДНК с применением РНК ревертазы), один цикл 45-60⁰С, 15-30 мин в термоциклере.

Амплификацию проводили по 40 циклам:

94⁰С - 15 сек;

55-65⁰С - 30 сек;

68⁰С - 1 мин;

И финальный цикл элонгации 68⁰С - 1 мин.

Результаты анализов визуализировали методом электрофореза в горизонтальном геле.

Для проведения реакции использовали праймеры диагностического набора для вируса ямчатости древесины яблони, подобранные фирмой-производителем.

Sense 5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3' (8993-9012).

Antisense 5'-ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT-3' (9237-9256).

Метод «Immunocapture». Мы изучали возможность проведения RT-PCR без выделения тотальной РНК классическим способом, а с применением метода «Immunocapture». Данный метод позволяет отлавливать вирусные частицы с помощью специфических антител, абсорбированных на стенке эппендорфа, и в дальнейшем использовать их в проведении ПЦР реакции. В эппендорф вносили диагностическую антисыворотку, разбавленную в соотношении 1:50 с буферным раствором и инкубировали 4 часа в термостате при температуре +37⁰С, затем промывали промывочным буфером pH-7,6 PBS с добавкой 5мл/100мл TWEEN-20, затем вносили гомогенизированный препарат, приготовленный из листьев травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis* 37В с симптомами ВЯДЯ. Далее инкубировали в термостате 1 час при температуре +37⁰С. Затем промывали промывочным буфером, вносили в эппендорф ПЦР смесь и проводили амплификацию.

Количество циклов амплификации согласно протоколу проведения ПЦР для вируса ямчатости древесины яблони:

	1 цикл	50 ⁰ С-30 мин,
		95 ⁰ С-5мин.
	40 циклов	94 ⁰ С-30сек,
		55 ⁰ С-40сек,
		72 ⁰ С-1 мин.
И финальный цикл элонгации	1 цикл	72 ⁰ С-10 мин.

После амплификации проводили электрофорез в горизонтальном геле с целью визуализации результатов реакции. Полимеразную цепную реакцию с применением

метода «Immunocapture» на стадии пробоподготовки проводили согласно методике, предложенной [117], и использовали праймеры, подобранные [117] к вирусу ямчатости древесины яблони:

Sense 5'-ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA-3' (8869-8895).

Antisense 5'- TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA-3' (9211-9238).

Данные праймеры позволили нам обнаружить вирус ямчатости древесины яблони в образцах.

Для статистической обработки первичного информационного массива использованы методы, изложенные Б.А. Доспеховым [17].

2.3. Схема закладки эксперимента

Начало эксперимента.

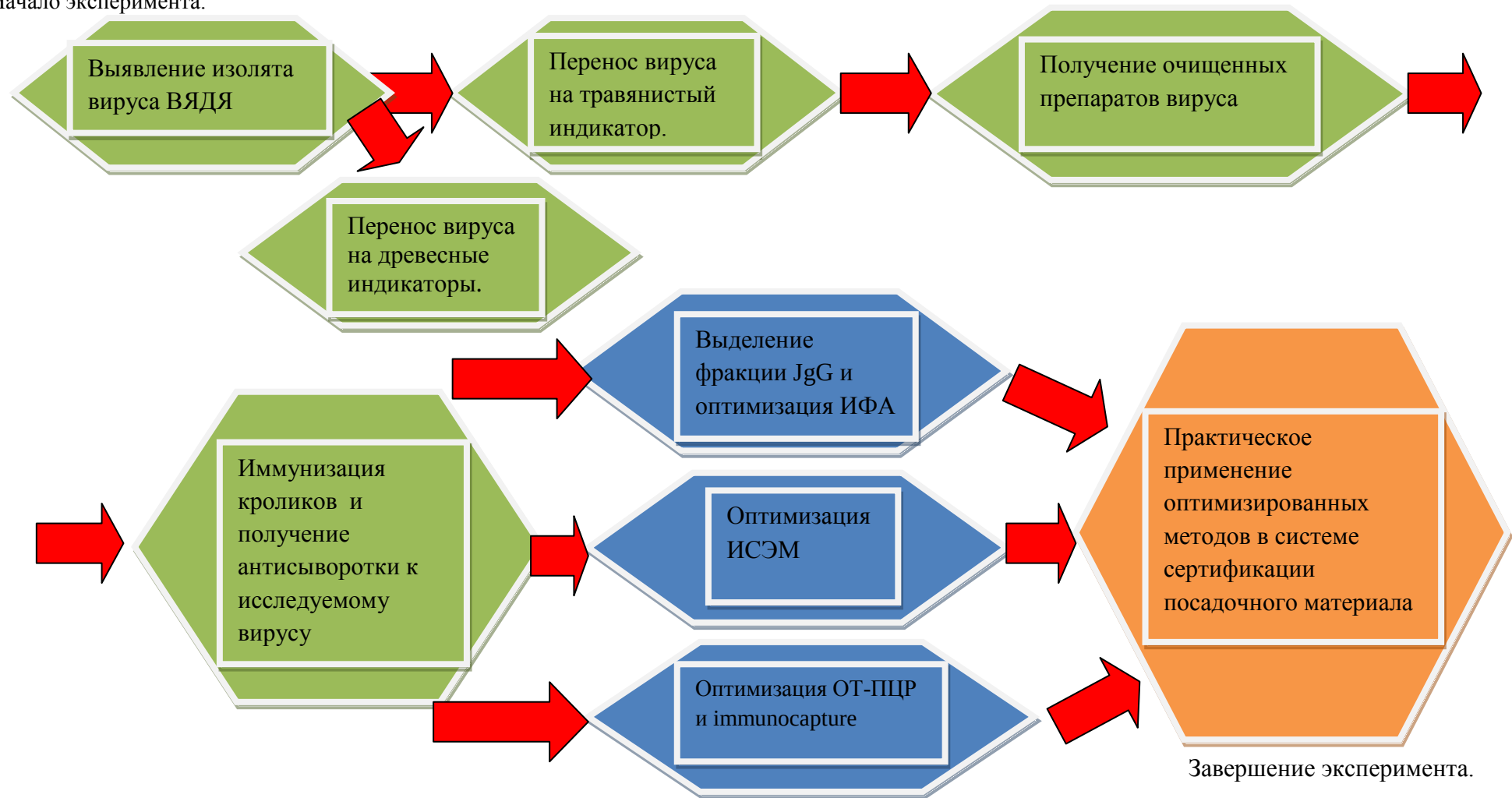


Рис. 2.1. Схема закладки эксперимента.

2.4. Выводы к главе 2

1. Для решения поставленных задач были выбраны биологические методы диагностики с использованием древесных и травянистых индикаторов и современные лабораторные методы с высокой разрешающей способностью выявления патогенов.
2. Составлена схема закладки эксперимента, позволяющая проследить этапы и последовательность выполнения исследований.

3. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ (ВЯДЯ)

3.1. Выявление изолятов вируса, перенос и накопление на древесных и травянистых индикаторах

Выявление изолятов ВЯДЯ проводили в период цветения семечковых культур в коллекционно-селекционном саду НПИСВиПТ с целью отбора вирулентных штаммов вируса ямчатости древесины яблони для переноса и последующих исследований на древесных и травянистых индикаторах. Наличие ВЯДЯ в отобранных образцах определяли методом иммуносорбентной электронной микроскопии с использованием антисыворотки к исследуемому вирусу, предоставленной доктором Н. Yanase (Япония). В качестве источника вирусных частиц использовали экстракты из лепестков, в которых, по данным [20], содержится наибольшее количество частиц двух других нитевидных вирусов яблони - хлоротической пятнистости листьев и бороздчатости древесины яблони.

Препараты готовили на палладированных сетках, покрытых коллодиевой пленкой, и укрепленных углём в вакуумном испарителе ВУП-4.

Диагностическую антисыворотку разводили 0,05М К/Na-фосфатным буфером pH 7,4-7,6. Каплю разбавленной антисыворотки наносили на предметную сетку для покрытия её поверхности антителами. После промывки буфером предметную сетку сенсibilizировали на экстракте из тканей лепестков на фосфатном буфере с добавками, для стабилизации, окислительно-восстановительных процессов. В качестве добавок мы использовали 0,1% аскорбиновую кислоту, 0,1% сульфита натрия и 0,01% тиоглицерола. По завершении реакции антиген-антитело поверхность препарата промывали буфером для удаления механических остатков растительной ткани лепестков и инкубировали на антисыворотке того же разведения. Затем предметные сетки промывали дистиллированной водой и контрастировали несколькими каплями 2-3% водного раствора уранилацетата.

Приготовленные препараты сканировали в электронном микроскопе TESLA BS-500 при увеличении 14000. Критерием отбора изолятов служило наибольшее количество выловленных на сетке частиц вируса.

Изоляты ВЯДЯ мы использовали в дальнейшей работе по переносу на древесные и травянистые индикаторы.

Полученные нами результаты по поиску вирулентного штамма ВЯДЯ с использованием древесных индикаторов соответствуют данным, полученным в 1967 году в городе Костинброде (Болгария) [46] и в 1969 году в Молдавской ССР [8].

В результате проведённых исследований было отобрано 11 изолятов ВЯДЯ из яблони и три изолята ВЯДЯ из груши. Отобранные изоляты ВЯДЯ были перенесены на древесные индикаторы с целью сохранения и сравнения их реакции в ответ на заражение ВЯДЯ с описанными в литературе симптомами. В качестве индикаторов для диагностики были использованы рекомендуемые Европейским комитетом по кооперации исследований вирусных заболеваний плодовых культур *SPY-227* и *Virginia crab*. Кроме описанных индикаторов выделенные изоляты вируса ЯДЯ переносили и на индикаторные растения *R-12740/7A*, а также *Malus coronaria* Morton. Заражение индикаторов проводили в питомнике на однолетних сеянцах стандартным методом двойной окулировки или щитком. В каждом варианте окулировали по пять растений, а шестое растение оставляли в качестве контроля. Учёты в питомнике проводили в августе второго учётного года.

На первый - второй год после заражения на *SPY-227* мы наблюдали симптомы подавления роста, на третий год после заражения произошло отмирание *SPY-227*, как и описывается в литературе (рисунок 3.1). Мы перенесли ВЯДЯ на древесный индикатор *Virginia crab* и на третий год после заражения наблюдали ямчатость древесины *Virginia crab* (рисунок 3.2) и деформацию плодов *Virginia crab* (рисунок 3.3).



Рис. 3.1. Отмирание *SPY-227*



Рис. 3.2. Ямчатость древесины *Virginia crab*.



Рис. 3.3. Деформация плодов *Virginia crab*.

На других древесных индикаторах *Malus coronaria* Morton и R-12740/7A мы не наблюдали никаких видимых симптомов.

Описанным выше методом иммуносорбентной электронной микроскопии нами так же было протестировано 50 сортов и 102 гибрида яблони для определения степени распространённости ВЯДЯ и двух других латентных вирусов яблони - хлоротической пятнистости листьев яблони (ХПЛЯ) и бороздчатости древесины яблони (БДЯ) в обследуемых насаждениях Института плодоводства [27, 29]. Результаты обследования коллекции сортов яблони на заражение вирусом ЯДЯ и двумя другими латентными вирусами яблони представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. Результаты обследования коллекции сортов яблони на заражение вирусом ЯДЯ и двумя другими латентными вирусами яблони

№	Название сорта	Код образца	Вирусы		
			ВЯДЯ	ХПЛЯ	БДЯ
1	Remura	1/17/63	+	+	+
2	Corelita	1/16/63	-	-	
3	Noroc	2/44/28	-	-	
4	Priam	2/22/22	+	+	+
5	Redfree	2/1/27	-	-	+
6	Primula	2/5/46	+	+	-
7	Fuji	3/16/17	+	+	-
8	Braeburn	3/16/60	-	-	-
9	Royal Gala	3/32/11	+	+	-
10	Mutsu	3/17/64	-	-	+
11	Alie parusa	3/38/63	+	+	-
12	LisGolden	3/50/37	+	-	+

13	Ottava	3/58/1	+	+	+
14	Grany Smith	3/38/34	-	-	-
15	Elsten	3/48/27	-	+	+
16	Arlet	3/49/9	-	-	-
17	Kimmeria	3/38/23	-	-	+
18	Nowamac	3/53/20	+	+	-
19	Roşu de Cluj	3/44/12	+	+	-
20	Aromat de vară	3/45/1	-	-	-
21	Tare de Gîndă	3/45/25	+	+	+
22	Sho-525	3/45/30	+	-	+
23	Spur lord Derby	3/38/80	+	-	+
24	Corelita	3/52/1	-	+	+
25	Corecord	3/53/1	-	-	-
26	HAR5T8	3/44/4	-	+	+
27	Calvil de Moldova	3/39/17	-	-	-
28	Kaja	3/36/70	-	+	+
29	Naslednița	3/37/80	+	+	-
30	Mio	3/36/64	+	+	-
31	Campion	3/36/51	+	+	+
32	Djester	3/37/17	-	-	-
33	Jonaveld Red	3/49/34	-	-	-
34	B3b18,13	3/52/42	+	+	+
35	SRO-553	3/44/49	-	-	-
36	HAR13T130	3/45/23	-	-	-
37	Ardelean	3/45/21	+	+	+
38	Sarî Sinap	3/47/24	-	-	-
39	Parmair	3/46/24	-	-	-
40	Domnești	3/47/15	+	+	+
41	Slava Peremojțam	1/9/63	+	+	+
42	Țiganca Grie	3/46/15	-	-	-
43	Zg120st4,41	3/57/1	+	+	-
44	Gustav Durabil	3/44/21	-	+	+
45	Early Blase	3/45/12	+	+	+
46	Record Miciurina	3/44/76	-	-	-
47	Corezia	3/52/18	+	+	-
48	Corelia	3/53/11	-	-	-
49	Renet de Șampani	3/46/20	-	-	-
50	Rozmarin Alb	3/47/18	+	+	+

«+» наличие вируса. «-» отсутствие вируса.

Из данных таблицы 3.1 видно, что большинство сортов яблони коллекции Института плодоводства заражены комплексом латентных вирусов яблони. При этом комплексы латентных вирусов разные и состоят как из смеси вирусов ямчатости древесины яблони и хлоротической пятнистости листьев яблони, так и из всех трёх вирусов. Вирусом ямчатости древесины яблони заражены 24 сорта из 50. Вирусом хлоротической пятнистости листьев яблони заражены 27 сортов. Вирусом бороздчатости

древесины яблони заражен 21 сорт из 50 исследованных. Комплексом вирусов ямчатости древесины яблони и хлоротической пятнистости листьев яблони заражены 26 сортов. Также нами были протестированы гибриды яблони, представляющие селекционный интерес.

Известно, что вирус ямчатости древесины яблони не передаётся семенами, поэтому нами было решено протестировать только гибриды, закулированные на вегетативные подвои. В проведении данной работы большую помощь нам оказал заведующий лабораторией селекции Института плодоводства доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор исследователь Букарчук В.Ф., любезно предоставивший данные о локализации интересующих гибридов. После получения нами результатов обследования данные о зараженности были переданы доктору хабилитат сельскохозяйственных наук, профессору исследователю Букарчуку В. Ф. Данные тестирования гибридов яблони на зараженность ВЯДЯ и двумя другими латентными вирусами представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Результаты тестирования гибридов яблони на наличие ВЯДЯ и других латентных вирусов яблони

№	Код	Вирусы			№	Код	Вирусы			№	Код	Вирусы		
		вдл	вхл	вбл			вдл	вхл	вбл			вдл	вхл	вбл
1	1/2/43				35	1/11/33	-	-	-	69	1/1/13	-	-	-
2	1/17/43	+	+	+	36	1/7/33	-	-	-	70	1/15/53	-	-	-
3	1/7/63	-	-	-	37	1/13/42	-	-	-	71	1/17/3	+	-	+
4	1/1/63	-	-	-	38	1/12/43	-	-	-	72	1/13/13	-	-	-
5	1/5/63	-	-	-	39	1/16/42	-	-	-	73	1/15/13	-	-	-
6	1/14/63	-	-	-	40	1/15/23	-	-	-	74	1/10/13	-	-	-
7	1/11/43	-	-	-	41	1/8/24	-	-	-	75	1/11/13	-	-	-
8	1/10/64	-	-	-	42	1/9/24	-	-	-	76	1/13/3	-	-	-
9	1/4/63	+	+	+	43	1/7/43	+	+	+	77	1/10/4	-	-	-
10	1/6/62	-	-	-	44	1/10/53	-	-	-	78	1/1/24	-	-	-
11	1/13/52	-	-	-	45	1/4/13	-	-	-	79	1/4/23	-	-	-
12	1/9/63	+	+	-	46	1/16/3	-	-	-	80	1/5/23	-	-	-
13	1/8/42	-	-	-	47	1/10/23	-	-	-	81	1/14/43	-	-	-
14	1/9/43	-	-	+	48	1/7/14	-	-	-	82	1/5/13	-	-	-
15	1/2/63	-	-	-	49	1/2/33	-	-	-	83	1/12/13	-	-	-
16	1/6/43	-	-	-	50	1/4/33	-	-	-	84	1/14/13	-	-	-
17	1/1/43	-	-	-	51	1/11/54	-	-	-	85	1/8/63	-	-	-
18	1/11/62	-	-	-	52	1/16/24	-	-	-	86	1/10/43	-	-	-
19	1/3/53	-	-	-	53	1/12/33	-	-	-	87	1/3/64	-	-	-
20	1/16/53	-	-	-	54	1/11/24	-	-	-	88	1/1/33	-	-	-
21	1/7/53	-	-	-	55	1/14/53	-	-	-	89	1/5/43	-	-	-
22	1/17/53	+	+	+	56	1/10/32	-	-	-	90	1/9/13	+	-	+
23	1/15/43	-	-	-	57	1/3/42	-	-	-	91	1/2/3	-	-	-
24	1/12/53	-	-	-	58	1/12/33	-	-	-	92	1/6/3	-	-	-
25	1/5/53	-	-	-	59	1/9/55	-	+	+	93	1/4/3	-	-	-

26	1/16/33	-	-	-	60	1/3/13	-	-	-	94	1/5/3	-	-	-
27	1/8/33	-	-	-	61	1/6/53	-	-	-	95	1/2/13	-	-	-
28	1/17/33	-	-	+	62	1/1/53	-	-	-	96	1/12/3	-	-	-
29	1/16/63	-	-	-	63	1/13/63	-	-	-	97	1/3/23	-	-	-
30	1/2/53	-	-	-	64	1/3/33	-	-	-	98	1/9/33	+	+	+
31	1/8/13	-	-	-	65	1/6/13	-	-	-	99	1/13/23	-	-	-
32	1/4/43	-	-	-	66	1/17/63	+	+	+	100	1/16/12	-	-	-
33	1/17/13	+	+	+	67	1/13/33	-	-	-	101	1/8/3	-	-	-
34	1/6/23	-	-	-	68	1/15/63	-	-	-	102	1/15/33	+	+	+

«+» наличие вируса. «-» отсутствие вируса.

Из таблицы 3.2. видно, что гибриды заражены латентными вирусами яблони и в основном заражены комплексом латентных вирусов. В редких случаях нами обнаруживались образцы, зараженные одним вирусом. Только в образцах 14 и 28 мы наблюдали отдельно вирус бороздчатости древесины яблони.

На основании приведенных выше результатов тестирования нами составлена сводная таблица степени зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами, как каждым отдельным вирусом, так и наиболее часто встречающимся комплексом ЯДЯ+ХПЛЯ. Проведены математические расчёты ошибки выборочной доли и определен доверительный 95% интервал генеральной доли пораженных растений в совокупности [17]. Данные представлены в таблице 3.3. Расчёты представлены в Приложении 16.

Таблица 3.3. Зараженность сортов и гибридов латентными вирусами яблони

	Вирус ЯДЯ %	Вирус ХПЛЯ %	Вирус БДЯ %	Комплекс ЯДЯ+ХПЛЯ %	Всего заражено %
Сорта	48±14,2 33,8÷62,2	54±14,3 39,7÷68,3	42±14 28÷56	52±14,4 37,6÷66,4	64±13,8 50,2÷77,8
Гибриды	10,7±6,3 4,7÷17,3	9,8±5,7 4,1÷15,5	12,7±6,5 6,2÷19,2	8,8±5,3 2,7÷13,3	13,7±6,7 6,3÷19,7

Данные, приведённые в таблице 3.3., показывают, что сорта яблони в коллекции Института заражены латентными вирусами на 64 %, а гибриды на 13,7%. На 52% сорта заражены комплексом вирусов ямчатости древесины яблони и хлоротической пятнистости листьев яблони. Вирусом ямчатости древесины яблони сорта коллекции заражены на 48%, а гибриды на 10,7%. Вирусом бороздчатости древесины яблони и вирусом хлоротической пятнистости яблони на 42% и 54% соответственно [27, 29]. Что касается гибридов, их заражение произошло в момент их окулировки на подвои, зараженные вирусами, так как природные переносчики латентных вирусов яблони отсутствуют.

Изоляты ВЯДЯ отобраны из 11 образцов яблони и 3 сортов груши в результате тестирования коллекционно-селекционного сада НПИСВиПТ методом ИСЭМ, в том числе 2 изолята из Чехии и 2 изолята из Украины. Данные были использованы в дальнейших исследованиях для переноса вируса с древесных растений на чувствительный к данному вирусу травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37B. Работа проводилась с целью выявления наиболее вирулентного штамма ВЯДЯ, способного легко заражать растения названного травянистого индикатора и накапливаться в тканях в последующих пассажах в больших количествах, необходимых для очистки и получения диагностической антисыворотки.

Растения *Nicotiana occidentalis* 37B выращивали из семян, предоставленных профессором Ярославом Полак (Чехия) в ящиках на субстрате TS-3 (рисунок 3.4). Индикаторные растения заражали в стадии 3-4 настоящих листьев, предварительно опудрив листья карборундом для повреждения эпидермиса.



Рис. 3.4. Растения индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B на стадии заражения.

С целью увеличения восприимчивости растений индикаторов к инфекции растения до и после заражения 24 часа выдерживали в прохладной комнате при полной темноте. Для первичного переноса вируса нами были испытаны различные буферные смеси со стабилизирующими добавками (таблица 3.4.).

Таблица 3.4. Испытание буферных смесей для первичного переноса ВЯДЯ

№	Наименование буферных смесей	Исследуемые изоляты				
		1-9-63	1-15-13	3-38-80	1-17-63	3-32-11
1	0,05M pH-7,5 HEPES	-	-	-	-	-
2	0,02M pH-7,8 TRIS-HCl	-	-	-	-	-
3	0,05M pH-7,8 K/Na phosphate buffer +0.1% Na ₂ SO ₃ +0.1%Askor.acid+ +0.1%Tioglycerol	-	-	-	-	+

Из данных таблицы 3.4. видно, что положительные результаты получены в варианте №3 с использованием в качестве источника инфекции лепестков цветков яблони образца 3-32-11 и применением 0,05М рН-7,8 К/Na-фосфатного буфера с добавками 0,1% сульфита натрия, 0,1% аскорбиновой кислоты, 0,1% тиоглицерола. Лепестки цветков яблони гомогенизировали в предварительно охлаждённой ступке в буферном растворе в соотношении 1:2 в присутствии карборунда. Индикаторные растения *Nicotiana occidentalis* 37В до и после заражения выдерживали в прохладной и тёмной комнате для ослабления растений. Заражение проводили специально приготовленным тампоном из поролона, завернутого в марлю. Верхнюю часть листа, опудренную карборундом, натерли смоченным в инокулюме тампоном. После окончания заражения растения сбрызгивали водопроводной водой для смывания остатков инокулюма с натёртых листьев. При первичном переносе на 27-29 день после заражения на отрастающих листьях некоторых растений травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis* 37В появлялись симптомы в виде просветления жилок 2-3 порядка и жилковой мозаики (рисунок 3.5). Растения с системными симптомами использовались для проведения пассажей с целью дальнейшего накопления вируса в растении и использования их для получения очищенного препарата вируса ямчатости древесины яблони. Пассирование вируса из растений с симптомами проводили по такой же схеме и с применением тех же буферных смесей, что и при первичном переносе вируса, только вместо лепестков цветков использовали листья индикаторного растения *Nicotiana occidentalis* 37В с симптомами.

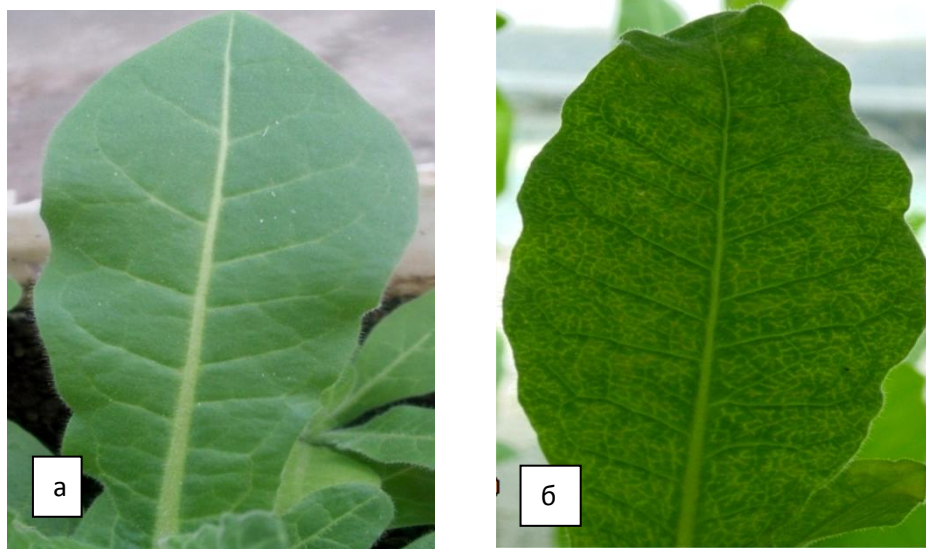


Рис. 3.5. Реакция травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis* 37В на заражение ВЯДЯ

а - Лист здорового травянистого индикатора.

б - Лист зараженного индикатора с симптомами вируса ямчатости древесины яблони (просветление жилок 2-3 порядка, жилковая мозаика).

Также нами были изучены варианты переноса вируса ямчатости древесины яблони из различных органов и тканей растения. Кроме лепестков мы использовали в опыте отрастающие листья и камбиальные ткани. В таблицах 3.5; 3.6; 3.7 отражены данные по переносу изолятов яблони и груши. Из данных таблицы 3.7. мы видим, что в образцах 3/32/11 происходил первичный перенос, однако изолят 3/32/11 оказался не вирулентным.

Таблица 3.5. Механический перенос ВЯДЯ на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37В

№	Наименование буферных смесей	Исследуемые изоляты					
		3/38/63 яблоня	3/50/37 яблоня	3/52/42 яблоня	3/37/80 яблоня	3/38/80 яблоня	2/22/22 яблоня
1	0,01М фосфатный буфер рН-7,0 +2% никотин основание	Л -	Л -	*	Л-	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
2	0,05М К/Na фосфатный буфер рН -7,6 + 0,1% сульфит натрия +0,1% аскорбиновая кислота +0,001 тиоглицерол	Л+	Л-	*	Л-	*	Л+
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
3	0,05М HEPES рН-7.5	Л-	Л-	*	Л-	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
4	0,02М Na/Na фосфатный буфер + 0,1% тиогликолевая кислота	Л-	Л-	*	Л-	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ+	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
5	Водопроводная вода +2% никотин основание	Л-	Л-	*	Л-	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-

Условные обозначения: Л-лепестки; ОЛ-отрастающие листья; КТ - камбиальные ткани;
«-» - отсутствие симптомов; «+» - зараженное растение с отчётливыми симптомами;
«*» - опыт не проводился.

Пассаж изучаемого вируса на растения того же индикатора с целью его накопления не дал положительных результатов. Растения - индикаторы, заражённые экстрактом из листьев с типичными симптомами вируса ямчатости древесины яблони, не проявили симптомов. Проверка бессимптомных растений на наличие вируса ямчатости древесины яблони методом иммуносорбентной электронной микроскопии не выявила присутствие вируса.

В каждом варианте заражали по 30-35 растений. Положительные результаты по выявлению вирулентных изолятов были получены в экспериментах с использованием в

качестве источника инфекции не только лепестков, но и других тканей выделенных изолятов и более широкого спектра стабилизирующих добавок к буферным смесям.

Из данных таблицы 3.6. мы видим, что лучший перенос ВЯДЯ происходит из тканей лепестков изолята 3/53/20, выделенного из коллекционно-селекционного сада Института плодоводства Молдовы, с использованием буферных смесей № 1 и 2.

Таблица 3.6. Механический перенос ВЯДЯ на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37B

№	Наименование буферных смесей	Исследуемые изоляты					
		3/53/20 яблоня	G-12 яблоня	SP-3 яблоня	VC-7 яблоня	10/21 яблоня	I/17/63 яблоня
1	0,01M фосфатный буфер pH-7,0 +2% никотин основание	Л ++	Л -	*	*	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ- #
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
2	0,05M К/Na-фосфатный буфер pH -7,6 + 0,1% сульфит натрия +0,1% аскорбиновая кислота +0,001 тиоглицерол	Л++	Л-	*	*	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
3	0,05M HEPES pH-7.5	Л-	Л-	*	*	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
4	0,02M Na/Na-фосфатный буфер +0,1% тиогликолевая кислота	Л-	Л-	*	*	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ+	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
5	Водопроводная вода +2% никотин основание	Л-	Л-	*	*	*	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-

Условные обозначения: Л- лепестки; ОЛ - отрастающие листья; КТ - камбиальные ткани; « - » - отсутствие симптомов; «++» - зараженное растение с отчётливыми симптомами; «*» - опыт не проводился; # - неспецифические симптомы;

При заражении изолятом 3/53/20 *Nicotiana occidentalis* 37B, мы наблюдали системные симптомы поражения вирусом на отрастающих листьях на 29-31 день после заражения. Дальнейший пассаж вируса на растения *Nicotiana occidentalis* 37B давал накопление вируса в больших количествах и классические симптомы просветления жилок 2-3 порядка появлялись на отрастающих листьях на 12-14 день после заражения. Обязательным условием накопления вируса при этом явилось выращивание заражённых растений индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B в условиях короткого дня и притенения растений. В период появления системных симптомов мы начинали сбор листьев, необходимых для

очистки. В дальнейшем от тех же растений отбирали листья с симптомами повторно, по мере их отрастания, и использовали их для очистки.

Таблица 3.7. Механический перенос ВЯДЯ на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37B

№	Наименование буферных смесей	Исследуемые изоляты					
		3/32/11 яблоня	1/15/13 яблоня	1/9/63 яблоня	№ 2 груша	№ 3 груша	№ 4 груша
1	0,01М-фосфатный буфер рН-7,0 +2% никотин основание	Л -	Л -	Л-	Л-	Л-	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
2	0,05М К/Na-фосфатный буфер рН -7,6 + 0,1% сульфит натрия +0,1% аскорбиновая кислота +0,001 тиоглицерол	Л+	Л-	Л-	Л-	Л+	Л
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
3	0,05М HEPES рН-7.5	Л-	Л-	Л-	Л-	Л-	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
4	0,02М Na/Na-фосфатный буфер + 0,1% тиогликолевая кислота	Л-	Л-	Л-	Л-	Л+	Л-
		ОЛ-	ОЛ+	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-
5	Водопроводная вода +2% никотин основание	Л-	Л-	Л-	Л-	Л-	Л-
		ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-	ОЛ-
		КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-	КТ-

Условные обозначения: Л- лепестки; ОЛ - отрастающие листья; КТ - камбиальные ткани; «-» - отсутствие симптомов; «+» - зараженное растение с отчётливыми симптомами.

На некоторых циклах пассирования системные симптомы вируса ямчатости древесины яблони имели не характерные некротические пятна на листьях (рисунок 3.6).



Рис. 3.6. Некротические пятна на листьях *Nicotiana occidentalis* 37B.

Как выяснилось, это происходило от большого потока солнечного света, поэтому было решено проводить затенение растений.

Нами была изучена возможность переноса ВЯДЯ и его накопления и на других травянистых индикаторах, в частности - *Cucumis sativus* (рисунок 3.7). Для переноса вируса мы использовали буферные смеси со стабилизирующими добавками, подобранные нами для первичного переноса вируса на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37B. Перенос вируса на *Cucumis sativus* проводили инокулятом, приготовленным из заражённых листьев индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B с видимыми симптомами, в стадии двух семядольных листочков. Растения *Cucumis sativus* перед заражением опудривали карборундом для повреждения эпидермиса листа. Вирус ямчатости древесины яблони на *Cucumis sativus* накапливался, но видимые симптомы не проявлялись. Это затрудняло определение его наличия в индикаторных растениях, но по данным иммуносорбентной электронной микроскопии мы могли судить о наличии вируса.



Рис. 3.7. Травянистый индикатор - *Cucumis sativus*, заражённый ВЯДЯ.

Симптомы поражения вирусом ВЯДЯ, полученные нами на SPY-227 и *Virginia crab*, соответствуют описанному в литературе, и по характеристикам совпадают с симптомами, полученными другими учёными, которые занимались проблемой переноса вируса ямчатости древесины яблони на древесные индикаторы [35, 36, 41, 158].

Результаты, полученные нами в процессе тестирования коллекции яблони НПИСВиПТ, показывают, что заражённость сортов яблони в процентном соотношении выше, чем заражённость гибридов. Это можно объяснить тем, что полученные гибриды окулировались на подвой, свободные от латентных вирусов. Смешанные инфекции

вирусов встречаются чаще. Аналогичные данные были получены в Чехии при обследовании сортов яблони на наличие вирусов ВБДЯ и ВЯДЯ [106].

Отобранные нами изоляты ВЯДЯ и перенесённые на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis 37B* проявляли симптомы просветления жилок 2-3 порядка, жилковую мозаику. Аналогичные данные получены в работах [79] по поиску травянистого индикатора, восприимчивого к ВЯДЯ и [107], при изучении цитопатологии ВЯДЯ в *Nicotiana occidentalis 37B*. Результаты, полученные нами при пассировании ВЯДЯ, и проявившиеся некротические пятна на *Nicotiana occidentalis 37B* в литературе не описаны и, как выяснилось, это происходит от интенсивного воздействия солнечного света.

Результаты опыта по переносу и накоплению вируса на травянистый индикатор *Cucumis sativus* аналогичны результату, полученному в Голландии [79].

Таким образом, полученные нами результаты в опытах по переносу из различных тканей изолятов вируса ЯДЯ с применением пяти различных буферных смесей со стабилизирующими добавками, свидетельствуют об уникальности опыта, так как аналогичных данных автором не обнаружено.

3.2. Получение очищенных препаратов вируса ямчатости древесины яблони

Успешная экстракция вирусных частиц из клеток заражённых тканей во многом зависит от этапа осветления растительного сока. На этом этапе очистки из исследуемого экстракта удаляются мелкие механические ткани, органеллы и другие компоненты клеток, а также низкомолекулярные белки. Их удаление осуществляется различными активными или нейтральными химическими соединениями. Однако на этом этапе кроме перечисленных компонентов клеток заражённых тканей теряются и вирусные частицы. И эта потеря существенно ощутима у вирусов, склонных к агрегации. Учитывая особую предрасположенность частиц ВЯДЯ к линейной агрегации, мы провели испытания методов очистки с различными способами осветления растительного экстракта. Целью настоящих исследований была разработка методики получения очищенного препарата с высокой концентрацией частиц, свободного от нормальных белков растения-хозяина, для производства высокоспецифической антисыворотки, пригодной для диагностики вируса ВЯДЯ методами иммуноферментного анализа и иммуносорбентной электронной микроскопии.

В экспериментах по разработке схемы очистки выделенного нами молдавского изолята ВЯДЯ за основу были взяты два метода очистки, разработанные в Японии [103] и Голландии [87].

В первом случае исследования касались непосредственно очистки вируса ямчатости древесины яблони, изоляты которого японские исследователи получили для изучения биохимических параметров из Голландии, где этот вирус был впервые успешно перенесён на некоторые линии травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B.

В экспериментах, где испытывали методику, разработанную японскими исследователями, осветление растительного экстракта проводили гелем, состоящим из двухзамещенного фосфата натрия и хлористого кальция. Для этого системно инфицированные отрастающие листья индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B гомогенизировали в 0,02М фосфатном буфере pH-7,4 в соотношении 1:4. В растительный экстракт после низкоскоростного центрифугирования добавляли по каплям при постоянном перемешивании на магнитной мешалке 1М Na₂HPO₄ в количестве 6 мл на каждые 100мл растительного сока и 1,5 мл/100мл 2М CaCl₂ при тех же условиях. Указанное соотношение растворов химических веществ приводило к образованию геля, присутствие которого способствовало удалению клеточных компонентов и к осветлению исследуемого растительного сока. Полученный после низкоскоростного центрифугирования осветлённый препарат центрифугировали на 20% сахарозной подушке при 120000g в течение 90 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,01М Na-фосфатном буфере с добавлением 0,5% Тритона X-100. После низкоскоростного центрифугирования препарат ультрацентрифугировали на 30% сахарозной подушке при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 0,01М боратном буфере pH-8,0 с добавлением 0,5М мочевины для уменьшения агрегации частиц. Проверка в электронном микроскопе показала наличие в препарате нитевидных вирусных частиц. При определении степени чистоты вирусного препарата от примеси нормальных белков растения-хозяина с помощью спектрофотометра характерную кривую мы не получили. Возможно, это было связано с недостаточным осветлением растительного экстракта на начальном этапе очистки. Попытки концентрировать вирус в градиенте плотности сахарозы оказались неудачными, так как фракционирование препарата в градиенте плотности сахарозы 10-40% привело к образованию широкой диффузной опалесцирующей зоны. Из-за возможной потери вируса в процессе диализа при удалении сахарозы извлеченную диффузную зону разводили не менее чем в 5 раз и ультрацентрифугировали при 120000 g в течение 90 мин. При определении степени чистоты вирусного препарата от примеси нормальных белков с использованием спектрофотометра, мы не получили кривую, характерную для нуклеотида.

Учитывая неудовлетворительные результаты, полученные нами при очистке ВЯДЯ по методу японских исследователей, мы приступили к исследованиям по испытанию

методики очистки другого удлинённого вируса с приближёнными морфологическими параметрами, предложенной голландским исследователем Van Oosten [87]. Автор проводил разработку данного метода для очистки вируса шарки из тканей системно заражённых листьев индикатора *Nicotiana clevelandii*. Частицы вируса шарки имеют морфологические параметры 750x14-16 нм, что на 50 нм короче частиц исследуемого нами молдавского изолята ВЯДЯ.

Существенная разница между этими методиками заключается в том, что голландский исследователь при разработке методики очистки вируса шарки для осветления растительного экстракта применил TRITON X-100. Автор, впервые применивший TRITON X-100 для осветления растительного экстракта, пришёл к выводу, что добавление этого вещества приводит к растворению клеточных мембран и хлоропластов перед высокоскоростным центрифугированием. Он предположил, что это способствует высвобождению большого количества вируса и уменьшению потерь, связанных с агрегацией вируса в осадке после ультрацентрифугирования.

Для испытания данной методики в наших целях после гомогенизации заражённых тканей травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B в присутствии буферного раствора и последующего низкоскоростного центрифугирования в растительный экстракт добавляли по каплям 3-5% TRITON X-100, который в течение 30 мин осторожно перемешивали на магнитной мешалке при температуре +4°C с последующим ультрацентрифугированием надосадочной жидкости в течение 90 мин при 90000 g. Осветлённый растительный сок центрифугировали 10 мин при 5000 g. Проверка в электронном микроскопе показала наличие в препарате многочисленных нитевидных частиц различной длины (рисунок 3.8).

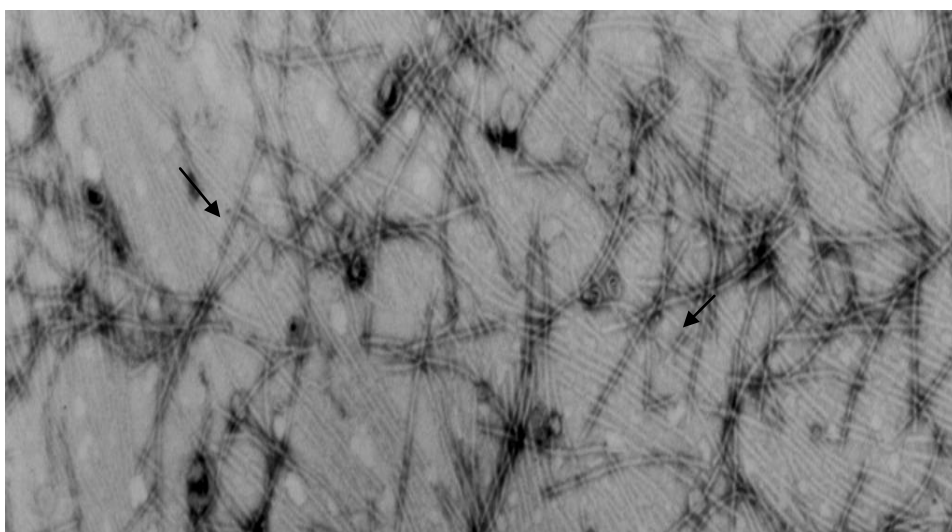


Рис. 3.8. Частицы вируса ямчатости древесины яблони до ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы. → Указаны частицы ВЯДЯ. Увл. x18000.

Однако попытки фракционировать вирус в градиенте сахарозы 10-40% были неудачными, поскольку вирусные частицы необратимо выпадали в осадок.

Испытание различных буферных смесей для приготовления градиента (0,01М, pH-7,8 фосфатный буфер, 0,01М pH-7,6 Трис HCl буфер, 0,05М pH-7,5 ГЕПЕС буфер, 0,005 М pH-8,0 боратный буфер) также не дало положительных результатов.

Метод предварительного замораживания заражённого растительного материала перед очисткой, применённый впервые для очистки другого латентного вируса - хлоротической пятнистости листьев яблони, также не дал положительных результатов, хотя в электронном микроскопе вирусные частицы всегда обнаруживались.

В последующих исследованиях по разработке метода очистки молдавского изолята ВЯДЯ мы вернулись к разработкам японских исследователей [103] с некоторыми изменениями, которые касались первого этапа очистки, а именно, осветления растительного экстракта. Вместо осветления растительного экстракта гелем, который образуется при добавлении в него двухзамещенного фосфата натрия и хлористого кальция, мы использовали TRITON X-100. Кроме того, перед началом процесса очистки заражённые листья замораживали в течение 24 часов при температуре -20-22⁰С. Таким образом, осветлённый растительный экстракт ультрацентрифугировали при 90000 g в течение 90 мин. Полученный осадок суспендировали и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин для удаления примеси.

Предварительно очищенную вирусную суспензию далее очищали по методике японских исследователей. Осветлённый препарат центрифугировали на 20% сахарозной подушке при 120000g в течение 90 мин. Полученный осадок суспендировали в 0,01М Na-фосфатном буфере с добавлением 0,5% Тритона X-100. После низкоскоростного центрифугирования препарат центрифугировали на 30% сахарозной подушке при тех же условиях. Осадок суспендировали в 0,01М боратном буфере pH-8,0. Для дальнейшей концентрации вируса мы проводили фракционирование препарата в градиенте плотности сахарозы 10-40%. После фракционирования в градиенте плотности сахарозы наблюдали опалесцирующую зону, которую отбирали шприцом, разбавляли не менее чем в 5 раз и концентрировали ультрацентрифугированием.

Проверка очищенного препарата в электронном микроскопе показала наличие нитевидных частиц, морфология которых не была нарушена (рисунок 3.9).

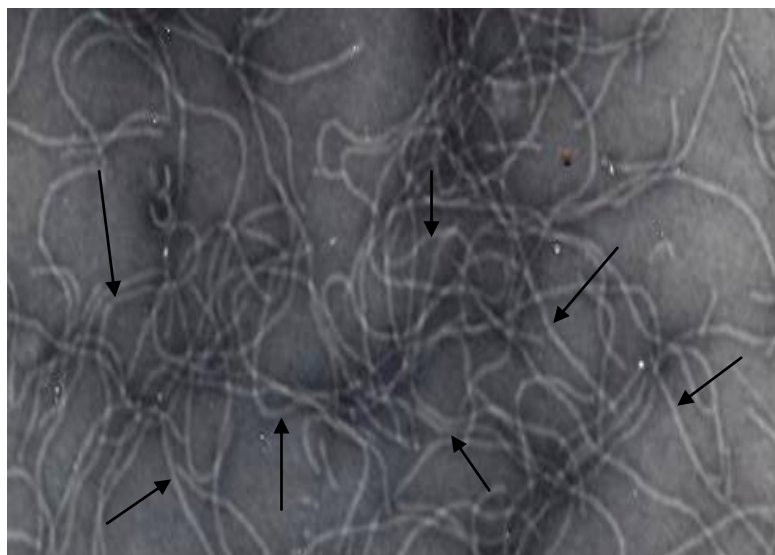


Рис. 3.9. Очищенный препарат вируса ямчатости древесины яблони. → Указаны частицы вируса ямчатости древесины яблони. Увл. x18000.

Чистоту и концентрацию вируса ЯДЯ в очищенном препарате проверяли методом спектрофотометрии на спектрофотометре SPEKOL-1500 (рисунок 3.10).



Рис. 3.10. Спектрофотометр SPEKOL-1500.

Полученная нами спектрофотометрическая кривая очищенного препарата, полученного по оптимизированной методике, имела один пик с минимумом при длине волны 240 нм и с максимумом при длине волны 258 нм, что характеризовало препарат как нуклеопротеид (рисунок 3.11).

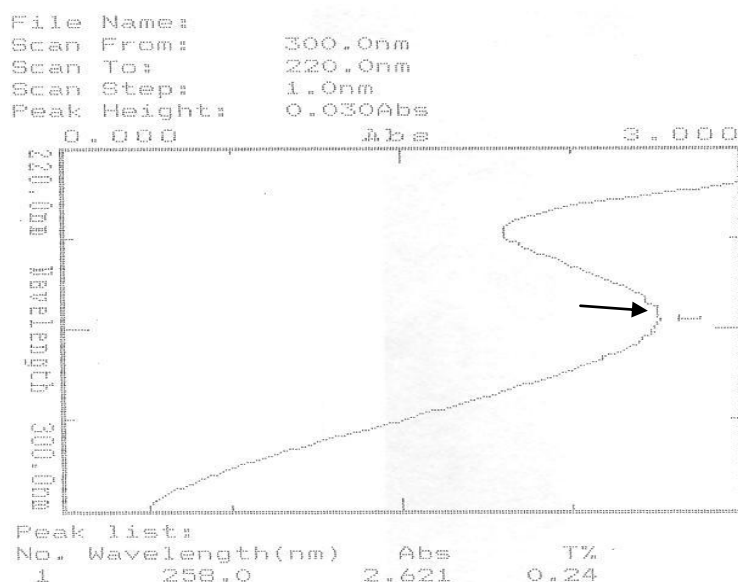


Рис. 3.11. Спектрофотометрическая кривая очищенного препарата ВЯДЯ.

→ Указан макс при длине 258 нм.

Отношение величины A_{260}/A_{280} равно 1,5-1,8, что согласуется с данными литературы [55].

Оптимизированная нами методика очистки вируса ямчатости древесины яблони включала следующие этапы:

1. 65 г инфицированных листьев индикаторного растения *Nicotiana occidentalis* 37B замораживали в течение 24 часов при температуре -18-22°C. Замороженные листья гомогенизировали в 350 мл 0,02М натрий-фосфатном буфере pH 7,0-7,2 с добавлением 0,5% TRITON X-100 и 0,1% тиоглицерола.
2. Низкоскоростное центрифугирование BECKMAN J2-21M, Rotor14 - 5000g -10 мин.
3. Добавляли к надосадочной жидкости 5% TRITON X-100 и на магнитной мешалке оставляли на 30 мин в холодильнике.
4. Ультраскоростное центрифугирование BECKMAN L8-80M, Rotor 70 Ti - 90000 g - 90 мин.
5. Суспендирование осадка в 0,01М натрий-фосфатном буфере pH-8,0 с добавлением 0,5М TRITON X-100.
6. Низкоскоростное центрифугирование BECKMAN J2-21M, Rotor14 - 5000g -10 мин.
7. Надосадочную жидкость наслаивали на 20% сахарозную подушку, разведённую на 0,01М натрий-фосфатном буфере.
8. Ультраскоростное центрифугирование BECKMAN L8-80M, Rotor 70 Ti - 120000g – 90 мин.

9. Надосадочную жидкость наслаивали на 30% сахарозную подушку, разведённую на 0,01М натрий-фосфатном буфере.
10. Суспендированный осадок ультрацентрифугировали в градиенте плотности сахарозы 10-40% BECKMAN L8-80M, BucketRotor 28, при 80000g - 180 мин.
11. Отбор вирусной зоны и концентрирование вируса при 120000g - 90 мин BECKMAN L8-80M, Rotor 70 Ti.
12. Осадок представляет собой очищенный препарат вируса ямчатости древесины яблони.

Такие препараты очищенного вируса были использованы для иммунизации подопытных животных.

Проводя эксперименты по получению очищенных препаратов ВЯДЯ, пригодных для иммунизации кроликов, на различных этапах очистки мы получили данные, аналогичные тем, которые получили [87, 92, 95, 103]. Применение нами TRITON X-100 на стадии осветления экстракта при очистке ВЯДЯ и полученные результаты не описаны в литературе. Полученная нами спектрометрическая кривая очищенного препарата ВЯДЯ и соотношение величины $A_{260/280}$, равное 1,5-1,8, соответствует полученным данным [55].

3.3. Получение антисыворотки и определение её качества

Подбор различных схем иммунизации определяется чувствительностью иммунологического метода, использованного в проводимом эксперименте [136].

Исследованиями Коенинг [102] установлено, что наиболее пригодными для иммуноферментного анализа являются антисыворотки, полученные в результате более позднего срока отбора крови, через два и более месяца от начала иммунизации.

Для получения антисывороток к ВЯДЯ нами была применена короткая схема иммунизации [16], состоящая из трёх инъекций подопытных кроликов с недельным интервалом, и двух реиммунизаций в момент падения до минимального значения титра антисыворотки. Для иммунизации были отобраны кролики №7 и №17 породы «Белый великан» весом 2500-2800 граммов соответственно. Количество вводимого препарата вируса составляло 200-300 мкг/мл. Первую инъекцию проводили с применением полного адьюванта Фрейнда, вводя вирусный препарат подкожно вдоль позвоночника. Через одну неделю вирусный препарат с неполным адьювантом Фрейнда вводили подопытным кроликам в большую мышцу задних ног. Третья инъекция проводилась введением чистого вирусного препарата в большие вены ушей кроликов. На 21 день от начала иммунизации у подопытных животных отбирали кровь из ушной вены для определения активности

антител в сыворотке крови (рисунок 3.12). Для этого на вене делали продольный разрез лезвием, вытекающую кровь собирали в пробирки. Отобранную кровь оставляли на несколько часов при комнатной температуре. После окончания ретракции сыворотку осторожно отделяли, центрифугировали и консервировали добавлением азида натрия.



Рис. 3.12. Отбор крови у подопытных животных.

Определение качества антисыворотки проводили методом иммуносорбентной электронной микроскопии. Для этого свежеполученную антисыворотку разводили 0,01 М Na/K - фосфатным буфером pH-7,4 до значений от 1:8 до 1:4096. Каждая фракция разведённой антисыворотки затем использовалась для приготовления препаратов с целью оценки активности антител полученной антисыворотки в электронном микроскопе. Критерием оценки конечного разведения антисыворотки (титра) служила специфическая реакция антиген-антитело, которая происходила при обработке выловленных на предметной сетке вирусных частиц из сырого сока заражённых растений *Nicotiana occidentalis 37B* антителами сыворотки соответствующего разведения (рисунок 3.13).

Исследования по определению качества антисыворотки методом иммуносорбентной электронной микроскопии проводили через каждые 7 дней. Процесс титрования повторяли до тех пор, пока активность антител сывороток не достигала минимального значения. Для восстановления активности антител на 62 день от начала иммунизации животные были реиммунизированы. Первая реиммунизация была проведена с полным адъювантом Фрейнда подкожно вдоль позвонков. Через неделю была проведена внутривенная инъекция.

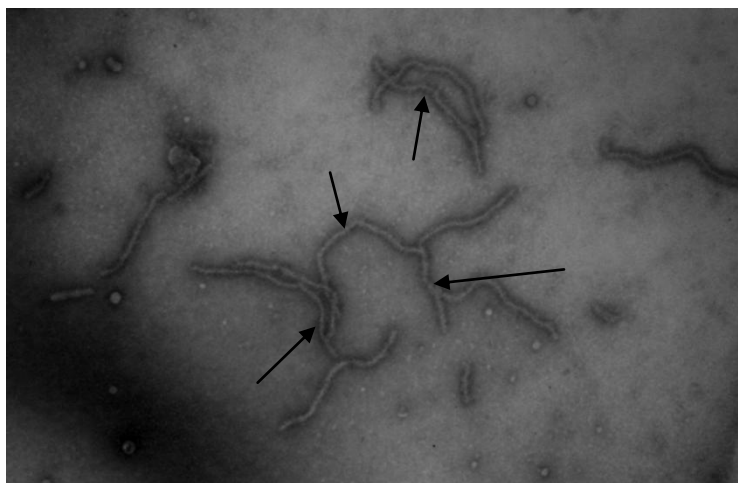


Рис. 3.13. Специфическая реакция антиген–антитело в препарате, приготовленном методом ИЭМ из листьев *Nicotiana occidentalis* 37B. Увл. x18000.

На 77 день у кролика №7 титр антисыворотки восстановился до значения 1:2048, а у кролика №17 титр антисыворотки наибольшего значения достиг на 82 день. Указанная выше активность антител полученных антисывороток держалась на максимальном уровне до 115 дня от начала иммунизации.

Результаты нарастания титра антисывороток крови подопытных кроликов в процессе иммунизации изображены на рисунке 3.14.

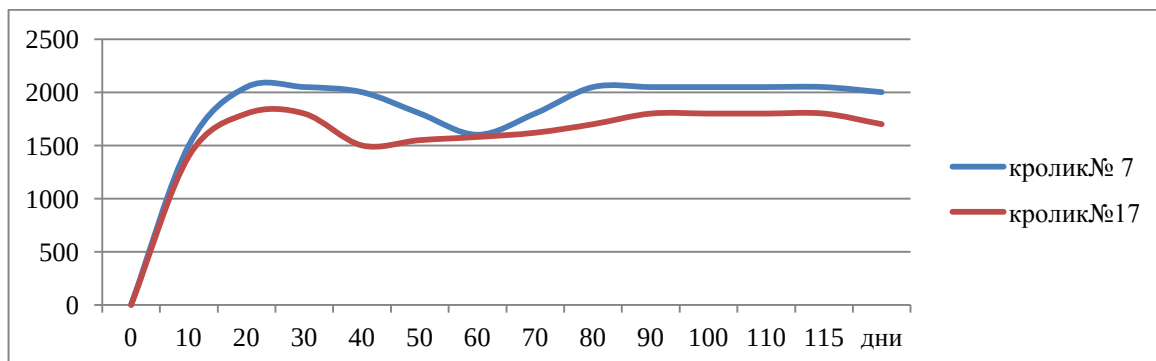


Рис. 3.14. Изменение титра антисыворотки к вирусу ямчатости древесины яблони в процессе иммунизации.

Сводные данные иммунизации подопытных животных по предложенной схеме представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. Сводные данные иммунизации подопытных животных

Инъекции и отбор крови	Дни	Титр сыворотки		Примечания
		Кролик №7	Кролик №17	
Инъекция	1	Подкожная инъекция		Использовали полный адъювант Фрейнда
Инъекция	7	Внутримышечная		Использовали неполный

		инъекция		адьювант Фрейнда
Инъекция	14	Внутривенная инъекция		Вводили чистый препарат
Отбор крови, титр	21	2048	1800	
Отбор крови, титр	28	2048	1800	
Отбор крови, титр	35	2048	1800	
Отбор крови, титр	43	2000	1500	
Отбор крови, титр	51	1800	1550	
Отбор крови, титр	58	1600	1580	
Реиммунизация	62	Подкожная инъекция		Использовали полный адьювант Фрейнда
Реиммунизация	69	Внутривенная инъекция		Вводили чистый препарат
Отбор крови, титр	77	1800	1620	Расфасовка в мелкую посуду по 15-20 мл. Добавление 0,02% Азида натрия и на хранение при -18 ⁰ -22 ⁰ С
Отбор крови, титр	81	2048	1800	
Отбор крови, титр	83	2048	1800	
Отбор крови, титр	90	2048	1800	
Отбор крови, титр	98	2048	1800	
Отбор крови, титр	114	2000	1700	

Полученные антисыворотки с высоким титром разливали в мелкие ёмкости по 15-20 мл, добавляли 0,02% азида натрия и помещали на хранение в низкотемпературный холодильник при температуре -18⁰С-22⁰С.

Полученная антисыворотка с высоким титром использовалась в дальнейшем для получения диагностического набора к исследуемому вирусу и оптимизации метода ИФА.

Схема иммунизации, использованная нами в эксперименте, позволила получить высокоспецифическую антисыворотку к ВЯДЯ. Подобная схема иммунизации была применена Kalashian [95]. При более позднем отборе крови от начала иммунизации у подопытных животных мы получали антисыворотки с более высоким титром. Такие антисыворотки наиболее пригодны для иммуноферментного анализа. Сходные результаты были получены Koenig [102].

3.4. Выводы к главе 3.

1. Отобран вирулентный штамм ВЯДЯ из 15 изолятов ВЯДЯ из яблони и 3 изолятов ВЯДЯ из груши. Обследована коллекция сортов и гибридов яблони на зараженность латентными вирусами яблони.
2. ВЯДЯ перенесён на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37В и накоплен в его тканях для получения чистого препарата.
3. Оптимизирована методика очистки ВЯДЯ с применением TRITON X-100 на этапе осветления растительного сока.
4. В результате иммунизации подопытных кроликов получена диагностическая антисыворотка к ВЯДЯ с титром 1:2048.

4. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ

4.1. Оптимизация условий проведения метода иммуноферментного анализа (ИФА)

Принцип ИФА основан на последовательном взаимодействии исследуемого вируса с сорбированными на твёрдой фазе антителами, меченными ферментом, с последующим выявлением фермента маркера в реакции с субстратом [77].

После разработки микро - варианта с использованием полистирольных микроплат с 96 лунками в качестве твёрдой фазы метод ИФА был впервые предложен для обнаружения фитопатогенных вирусов.

Среди существующих нескольких модификаций ИФА (прямой, непрямой, «сэндвич» - вариант) в фитовирусологии наиболее распространён «сэндвич» - вариант [71]. После получения антисыворотки в 1990 году и приготовления наборов для диагностики ВЯДЯ с применением «сэндвич» - варианта ИФА для обнаружения вируса многими учёными были получены положительные результаты.

Для постановки метода иммуноферментного анализа для диагностики молдавского изолята вируса ЯДЯ с использованием полученной нами высокоспецифической антисыворотки необходимо было выделить фракцию иммуноглобулина IgG и приготовить конъюгат. Выделение фракции IgG мы проводили методом аффинной хроматографии с применением в качестве сорбента protein A sepharose CL-4B SERVA (USA). Для этого в маленькой ёмкости замачивали 200 мг Protein A Sepharose CL-4B в 20 мл 0,1М фосфатном буфере pH-7,0 и оставляли для набухания на два часа при комнатной температуре. Затем устанавливали колонку, предварительно уложив на её дно фильтр- прокладку. После промывки фосфатным буфером колонку закрывали. Через 2 часа сливали фосфатный буфер над сефарозой, взбалтывали её и заполняли колонку доверху. После того, как над прокладкой формировался осадок сефарозы толщиной 2-3 мм, открывали краник и устанавливали скорость протекания 6-7 капель в минуту. Эту процедуру выполняли до тех пор, пока вся замоченная сефароза была залита в колонку при установленной скорости вытекания 6-7 капель в минуту. Затем сформированную колонку с гелем промывали, но уже 0,01М фосфатным буфером. Через 2 часа весь буфер выпускали и на поверхность геля вносили 1 мл сыворотки. После того, как сыворотка впитывалась, колонку закрывали на 30-60 мин для адсорбирования IgG на сорбент. Процесс элюирования начинали с промывки колонки 0,01 М фосфатным буфером pH 7,0. Через 10 мин после промывки отбирали первую фракцию и проверяли в спектрофотометре при длине волны 280 нм. Промывку колонки и сбор фракций продолжали до тех пор, пока спектрофотометр не

показывал значения экстинкции от 0,1 до 0,05. После того, как весь буфер вытекал из колонки, подставляли чистую пробирку и вносили 0,1М глицин HCl буфер pH-3,0. Процедуру промывки 0,1М глицин HCl буфер pH-3,0 и отбора проб проводили для элюирования фракции IgG с значениями показаний спектрофотометра от 1,0 до 3,0. В каждую отобранную пробирку с 2,5 мл раствора добавляли 250 мкл 1М K₂HPO₄. Отобранные фракции переносили в мешочки и диализировали против 1М фосфатного буфера в течение 24 часов при постоянном перемешивании со сменой буфера 4 раза. После диализа каждую фракцию повторно проверяли в спектрофотометре. Фракции с показаниями выше 1,4 OD (оптическая плотность) использовали для приготовления конъюгата. Считается, что показания 1,4 OD соответствуют концентрации 1 мг/мл.

В это же время нами проводились работы по выделению IgG с применением BrCN активированной сефарозы с целью получения сорбента, который мы использовали для выделения IgG из антисывороток. 5мг протеина А разводили в 5 мл 0,1М натрий-фосфатном буфере, содержащем 5мМ EDTA pH-8.0. К 0,28г BrCN activated Sepharose добавляли, 5мл полученного раствора протеина А и инкубировали 3 часа при перемешивании на качалке при комнатной температуре. К полученной смеси добавляли 50мМ сухого глицина, инкубировали 16 часов при перемешивании в холодильнике при температуре +4⁰С. Затем отмывали полученный сорбент на колонке и проводили дальнейшее выделение IgG из сывороток по описанной выше методике аффинной хроматографии.

Для приготовления конъюгата комплекса иммуноглобулинов с ферментом мы использовали щелочную фосфатазу активностью 10000 KU фирмы SIGMA (USA).

Щелочную фосфатазу центрифугировали 20-25 мин при 3000-3500 об/мин и быстро сливали надосадочную жидкость с последующим удалением остаточных капель фильтровальной бумагой. В полученный осадок микропипеткой вносили глобулины, тщательно перемешивали и ставили на диализ против PBS буфера в течение 24 часов. После диализа конъюгат переносили в тёмные ёмкости. Далее к 1000 мкл конъюгата добавляли 75 мкл 1% глутарового альдегида и помещали в тёмное место на 4 часа при комнатной температуре. Затем конъюгат диализовали против PBS буфера в течение 24 часов, меняя буфер через каждые 2 часа, а позже через каждые 3-4 часа. К полученному конъюгату добавляли 5 мг бычьего сывороточного альбумина и 1% азида натрия на 1мл конъюгата. Приготовленные таким образом фракции глобулинов IgG и конъюгат использовали для оптимизации условий идентификации молдавского изолята вируса ямчатости древесины яблони методом иммуноферментного анализа.

При разработке условий проведения ИФА ВЯДЯ изучали различные концентрации иммуноглобулинов и разведения конъюгатов. При различных разведениях иммуноглобулинов и конъюгата получили различные показания оптической плотности. Данные приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Показания оптической плотности при различных разведениях IgG и конъюгата при длине волны 405 нм

IgG Конъюгат	1:500	1:750	1:1000
1:500	0,72	0,78	0,94
1:750	0,78	0,78	1,08
1:1000	0,85	0,72	0,98

Для сенсibilизации микроплат использовали иммуноглобулины в разведении 1:500; 1:750; 1:1000. Иммуноглобулины разводили в карбонатном буфере pH-9,6. Адсорбцию антител на микроплатах проводили в течение ночи в холодильнике при температуре +4⁰С или 30 мин в термостате при +37⁰С.

В процессе приготовления конъюгата во время диализа изменяется объём глобулинов, поэтому конъюгат мы применяли не в абсолютной концентрации, а в разведениях 1:500; 1:750; 1:1000.

Оптимизацию ИФА проводили с использованием сырого сока индикаторного растения *Nicotiana occidentalis* 37В. Оптимальные показания оптической плотности (экстинции) при длине волны 405 нм были зафиксированы при разведении иммуноглобулинов в соотношении 1:1000, разведении конъюгата 1:750 и разведении сока 1:10. Аналогичные результаты мы получили и при разведении иммуноглобулинов и конъюгата, полученных с использованием BrCN активированной Сефарозы с Протеином А в качестве сорбента.

Нами был проведен эксперимент по проведению трехстадийного варианта ИФА. Метод заключается в последовательном инкубировании иммуноглобулинов, экстракта растительного сока и конъюгата. Одновременно нами был заложен эксперимент по проведению двухстадийного варианта ИФА, который заключался в совместном инкубировании экстракта растительного сока и конъюгата. При этом в двухстадийном ИФА использовались те же буферные смеси, что и в трёхстадийном варианте ИФА.

Результаты проведённых экспериментов представлены на рисунках 4.1 и 4.2.

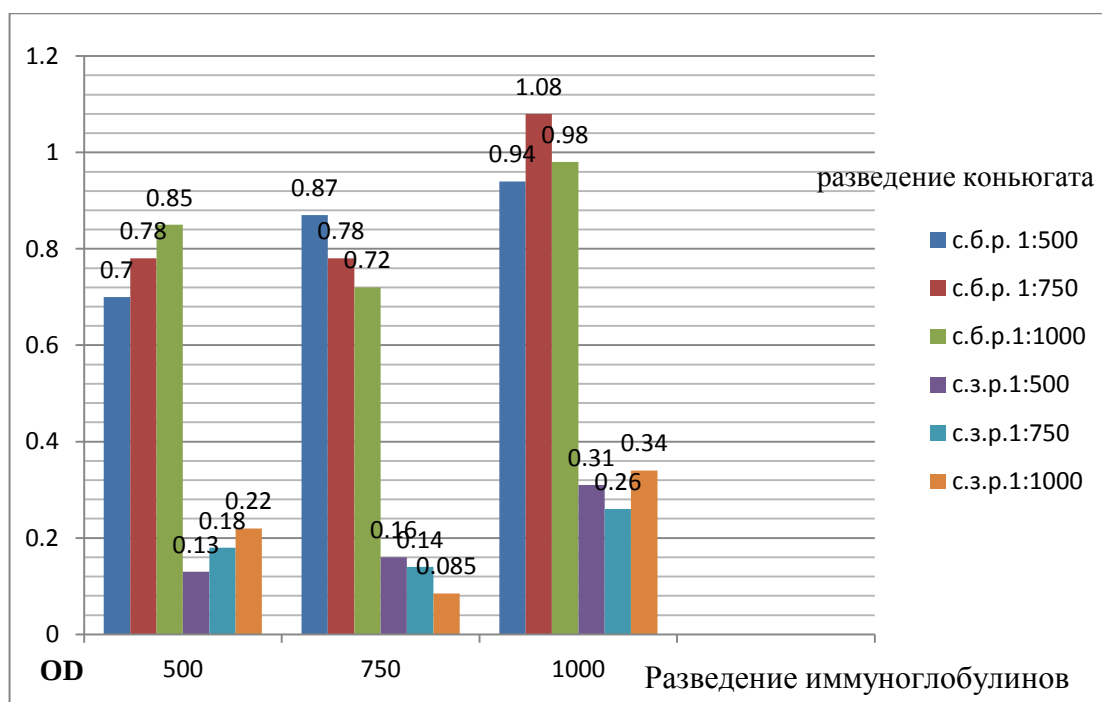


Рис. 4.1. Результаты оптимизации ИФА с тремя стадиями инкубации.
 с.б.р. – сок больного растения, с.з.р. – сок здорового растения,
 OD – показания оптической плотности.

Из данных, представленных на рисунке 4.1, видно, что наивысшее показание оптической плотности (экстинкции) мы получили в варианте ИФА с применением трёх стадий инкубаций. Первая стадия инкубации заключается в сенсibilизации микроплат иммуноглобулинами в различном разведении. Адсорбцию проводили в течение 3-х часов при $t+37^{\circ}\text{C}$ в термостате. Далее проводили трёхразовую промывку микроплат промывочным буфером. На второй стадии мы проводили инкубацию растительного экстракта, полученного из листьев индикаторного растения *Nicotiana occidentalis 37B* с симптомами вируса ямчатости древесины яблони. Гомогенизированный и осветлённый низкоскоростным центрифугированием растительный экстракт инкубировали в течение 3 часов при $t+37^{\circ}\text{C}$ в термостате. После инкубации растительного экстракта проводили трёхразовую промывку микроплат промывочным буфером. Заключительная стадия состоит в инкубировании конъюгата в различных разведениях, которую проводили в течение 3 часов при $t+37^{\circ}\text{C}$ в термостате. После инкубирования конъюгата проводили трёхразовую промывку и наносили субстратный буфер, состоящий из диэтаноламина и нитрофенилфосфата. Через 30 мин снимали показания оптической плотности при длине волны 405 нм. В результате оптимизации ИФА вируса ЯДЯ наивысшие показания оптической плотности получены при разведении иммуноглобулинов 1:1000, конъюгата 1:750 и растительного сока в соотношении 1:10. Данные разведения являются

оптимальными для проведения иммуноферментного анализа молдавского изолята вируса ямчатости древесины яблони.

На рисунке 4.2 показаны результаты применения двухстадийного варианта проведения ИФА.

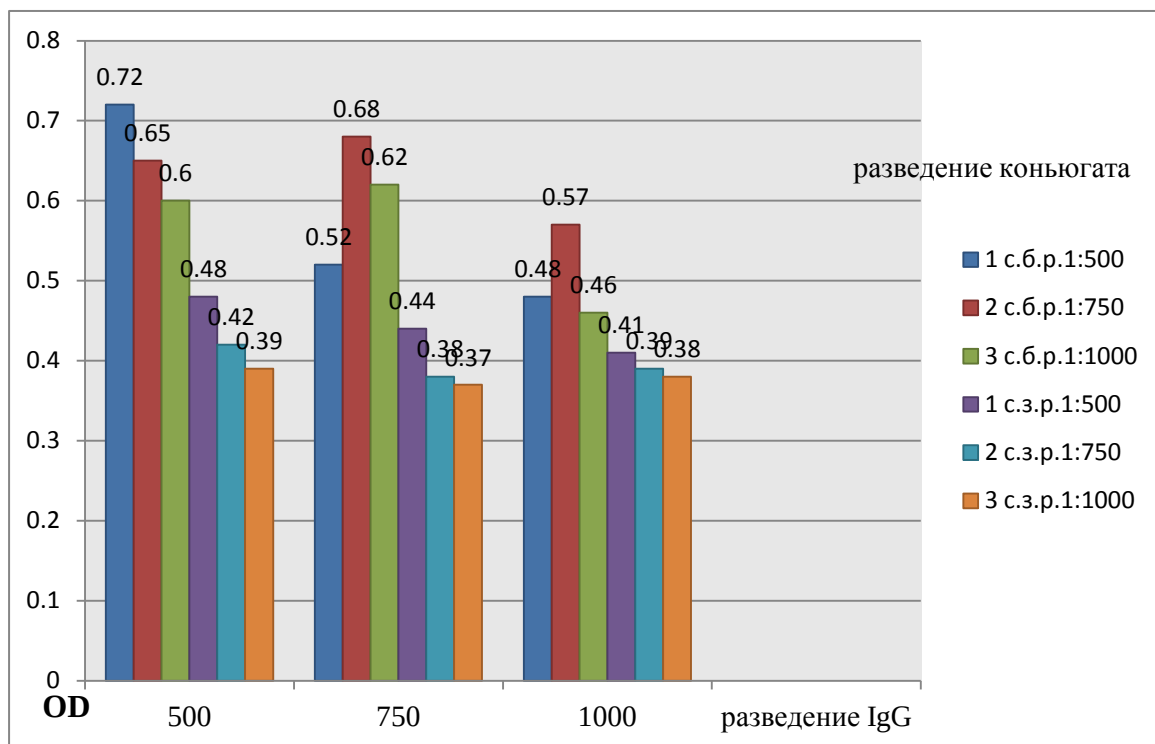


Рис. 4.2. Результаты оптимизации ИФА с двумя стадиями инкубации.
с.б.р. – сок больного растения, *с.з.р.* – сок здорового растения,
 OD – показания оптической плотности.

Наши исследования заключались в инкубировании конъюгата вместе с экстрактом растительного сока после сенсibilизации иммуноглобулинов на микроплаты. За основу были взяты те же разведения иммуноглобулинов, конъюгата и растительного сока, буферные растворы, что и в варианте проведения ИФА с применением трёх стадий инкубации. Полученные нами показания оптической плотности после окончания реакции привели нас к выводу о нецелесообразности применения данного двухстадийного варианта ИФА для исследуемого нитевидного ВЯДЯ.

Нестабильные показания оптической плотности нами также были получены в исследованиях по испытанию непрямого метода иммуноферментного анализа для диагностики молдавского изолята ВЯДЯ. Неудачные попытки оптимизировать данный вариант для исследуемого вируса, возможно, были связаны с этапом сенсibilизации микроплат протеином А. Эксперименты в этом направлении, будут продолжены.

Таким образом, испытания различных вариантов проведения иммуноферментного анализа показали, что для получения надёжных результатов диагностику молдавского изолята ВЯДЯ необходимо проводить согласно «сэндвич» - варианту ИФА, выполняя следующие последовательные этапы: сенсibilизация микроплат иммуноглобулинами в разведении 1:1000; разведение растительного сока в соотношении 1:10; использование конъюгата в разведении 1:750. При этом режимы инкубирования на всех стадиях в течение 3 часов при температуре +37⁰С в термостате.

Оптимизированная методика применялась нами в последующих исследованиях по изучению пригодности различных тканей и органов заражённых растений и сроков их отбора для диагностики вируса ЯДЯ в процессе тестирования. Данные представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Локализация ВЯДЯ в органах и тканях растения яблони

Исследуемые органы и ткани	Наличие или отсутствие вируса
Искусственно пробужденные почки	Вирус обнаруживался
Камбиальный слой 1-2-годичных побегов	Вирус обнаруживался
Естественно пробуждённые почки	Вирус обнаруживался
Лепестки цветков	Вирус обнаруживался в большом количестве
Ткани отрастающего листа	Вирус обнаруживался
Древесина 1-2-летних побегов в период покоя	Вирус не обнаруживался

Установлено, что наилучшим материалом для тестирования являются искусственно пробуждённые и естественно распустившиеся почки, лепестки, кора и листочки активно растущих побегов, использование которых позволяет надёжно диагностировать вирус ямчатости древесины яблони методом ИФА.

На основании полученных результатов нами определены календарные сроки отбора проб для достоверной диагностики ВЯДЯ методом ИФА в системе производства безвирусного посадочного материала. Данные представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3. Диагностика ВЯДЯ по срокам в тканях плодовых растений методом ИФА

	Месяцы тестирования											
Исследуемые органы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Искусственно пробуждённые почки	+	+	+									
Естественно пробуждённые почки			+	+								

Лепестки				+	+							
Кора и листья активно растущих побегов				+	+	+						
Спящие почки	-	-	-							-	-	-

Из данных таблицы 4.3. мы видим, что применение метода ИФА возможно только в первой половине астрономического года с использованием описанных выше тканей плодовых растений и применения трёхстадийного ИФА с рекомендуемыми разведениями иммуноглобулинов, конъюгата и растительного сока, а также соответствующих режимов инкубирования.

Применяя в качестве сорбента Protein A Sepharose CL-4B [64] для выделения фракции IgG, мы абсорбировали IgG на сорбент. Аналогичная абсорбция IgG была получена [72]. Что касается результатов проведённых нами исследований по иммобилизации протеина А с сорбентом BrCN активированной сефарозы для последующего выделения фракций IgG из сыворотки к ВЯДЯ, то сообщений о подобных исследованиях мы в литературе не встречали.

Для получения конъюгата мы использовали в качестве метки щелочную фосфатазу, аналогичные исследования с применением в качестве метки щелочной фосфатазы проводились [70].

Оптимизация временных и температурных режимов проведения трёхстадийного ИФА в «сэндвич» - варианте, применённая нами в эксперименте и показавшая наилучшие результаты, сходна с ранее полученными данными [70].

4.2. Усовершенствование и оптимизация метода иммуносорбентной электронной микроскопии (ИСЭМ)

Высокая чувствительность метода ИСЭМ позволила применить его для идентификации некоторых вирусов плодовых культур, которые присутствуют в растениях в очень низких концентрациях.

Основой наших исследований послужила методика специфического вылавливания вирусных частиц (иммуносорбентная микроскопия), разработанная [74]. В соответствии с этой методикой:

- сетки с коллодиевой плёнкой предварительно обрабатывали антисывороткой к данному вирусу в разведениях от 1:5 до 1:1600 (используется один буфер);
- после обработки антисывороткой сетки промывали 10 каплями буфера;
- инкубировали на экстракте из листьев *Nicotiana occidentalis* 37В;

- через 60 мин промывали 20 каплями буфера и 30 каплями дистиллированной воды;

- сетки контрастировали 3% водным раствором уранилацетата.

При просмотре в электронном микроскопе выявление вирусных частиц было затруднено из-за слабого их контраста. Увеличения контраста вирусных частиц достигали использованием модификации [120], названной методом декорирования. Препараты после инкубации на экстракте повторно обрабатывали антисывороткой и контрастировали 2% раствором уранилацетата. В результате адсорбции антител диаметр вирусных частиц увеличивался, они интенсивно контрастировались и легко выявлялись при просмотре препаратов в электронном микроскопе.

После отработки метода и определения оптимальных условий препарирования вируса ЯДЯ из *Nicotiana occidentalis 37B* мы приступили к выявлению этого вируса непосредственно в экстрактах заражённых древесных растений.

В первоначальных экспериментах по изучению оптимальных условий приготовления препаратов для диагностики ВЯДЯ испытывались те же буферные смеси, которые использовались для диагностики вирусов ХПЛЯ и БДЯ: 0,05М Трис HCL буфер pH - 7,5 и 0,05М ГЕПЕС буфер pH - 7,5, а так же 0,05М Na/K-фосфатный буфер pH - 7,8.

В своих исследованиях мы использовали 0,05М Na/K-фосфатный буфер pH 7,6-7,8. Препараты готовились непосредственно из пораженных тканей плодовых культур (рис.4.3). Однако из-за низкой концентрации вируса в исследуемых тканях [53] эксперименты по оптимизации ИСЭМ для идентификации ВЯДЯ были продолжены с использованием заражённого индикатора *Nicotiana occidentalis 37B*.

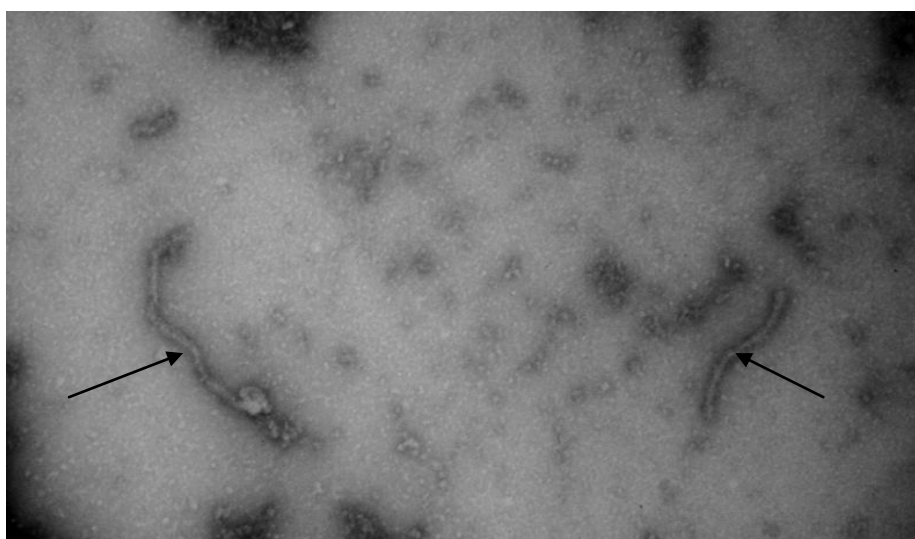


Рис. 4.3. Препарат, приготовленный из пораженных тканей плодовых культур.

Увл.х18000. —————> Указаны вирусные частицы.

Ткани этих листьев служили источником инфекции и использовались в экспериментах по оптимизации метода ИСЭМ для надежного выявления вируса ямчатости древесины яблони. В первых же препаратах были выявлены частицы, длина которых колебалась в пределах от 400 до 1000 нм и более.

Часто в препаратах встречались линейно-агрегированные частицы длиной до 3200 нм (рис. 4.4).

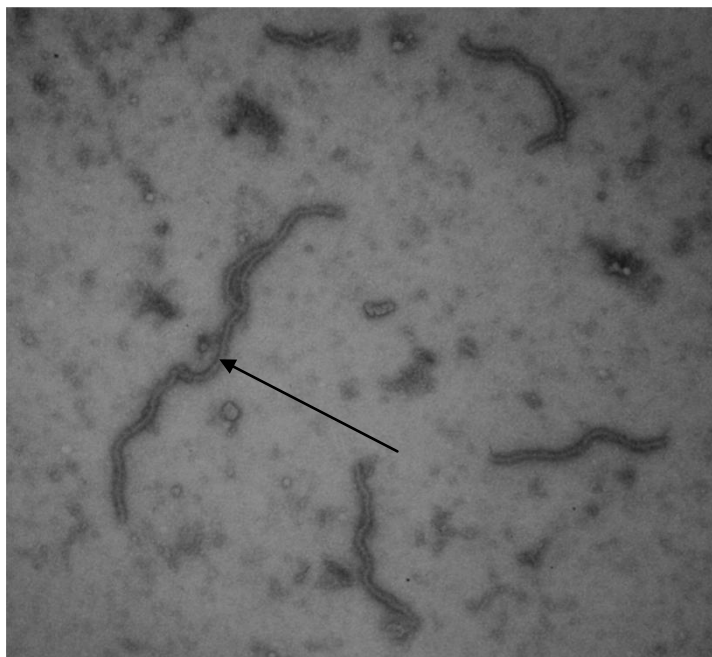


Рис. 4.4. Линейно-агрегированные частицы вируса ямчатости древесины яблони.

————→ Указаны агрегированные частицы вируса ЯДЯ. Увл x18000.

Однако ширина обнаруженных частиц всегда была около 28-30 нм. Следует отметить, что концентрация частиц в препаратах была низкой, как и в случае, когда препараты первоначально готовили из тканей плодовых культур. Следующим шагом в оптимизации ИСЭМ было добавление в буферную смесь TRITON X-100 в концентрации 0,5%. Данный препарат способствовал не только блокированию процесса линейной агрегации, но и приводил к большему вылавливанию частиц за счёт уменьшения вязкости растительного экстракта. В препаратах выявлялись частицы такой длины, которые никогда не обнаруживались при использовании в качестве стабилизирующего агента поливинилпиролитона PVP-25. Кроме того, гомогенат во время инкубации в течение 30 мин при $t+37^{\circ}\text{C}$ менял окраску, указывая на то, что в нем идут активные окислительно-восстановительные процессы. Возможно, добавление в буферную смесь TRITON X-100 в концентрации 0,5% и приводило к раздроблению частиц, хотя процесс декорирования проходил удовлетворительно. На рисунке 4.5 показаны раздробленные частицы вируса ямчатости древесины яблони.

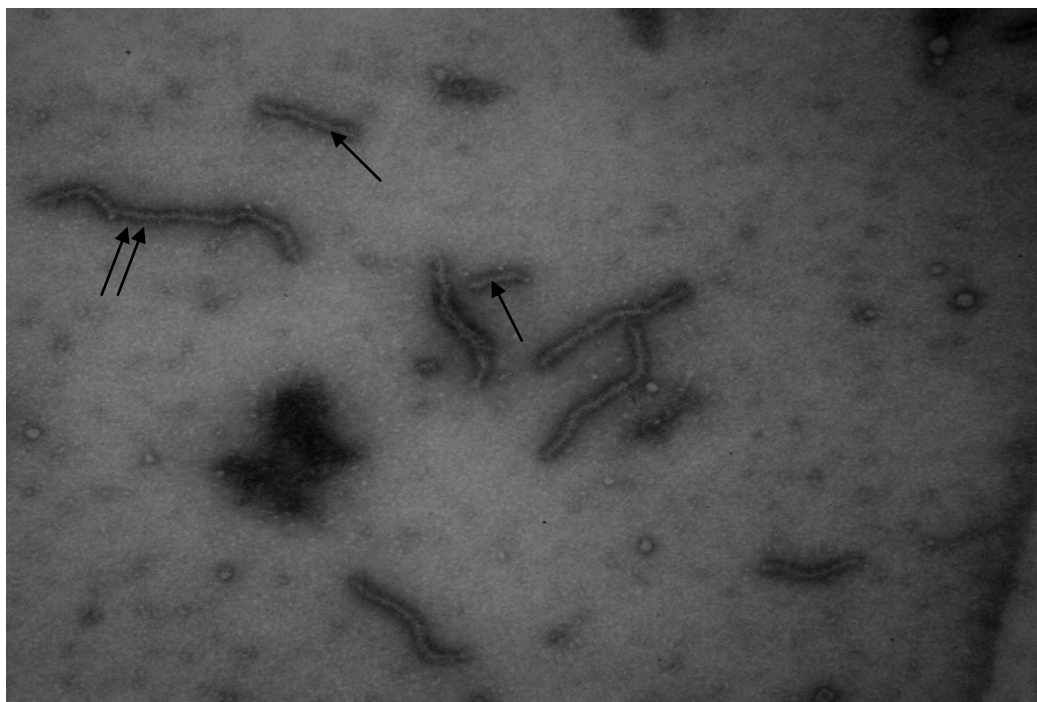


Рис. 4.5. Раздробленные частицы вируса ямчатости древесины яблони.

→ Указаны раздробленные частицы вируса ЯДЯ. ⇨ Указана не раздробленная частица вируса ямчатости древесины яблони. Увл x18000.

Для блокирования окислительных процессов в экстрагирующий буфер добавляли антиокислительные компоненты сульфит натрия и аскорбиновую кислоту в таких же концентрациях, что и для переноса этого вируса из тканей плодовых на травянистые индикаторы. Блокирование окислительных процессов позволило получить удовлетворительные препараты, в которых вирусные частицы были равномерно декорированы по всей длине, и частично была блокирована линейная агрегация.

Завершив серию экспериментов по оптимизации метода ИСЭМ с использованием тканей зараженных индикаторов, мы приступили к препарированию этого вируса непосредственно из тканей пораженных растений плодовых культур. Препараты готовили с использованием буферной смеси с добавками, которые применяли при препарировании исследуемого вируса в сыром соке травянистых индикаторов. Использование такой смеси позволило надёжно выявлять частицы вируса ямчатости древесины яблони в экстрактах тканей искусственно пробуждённых почек, лепестков цветков в большом количестве, черешков и листьев, активно растущих побегов, плодов и коры 1-2-летних побегов в течение года.

В дальнейшем при диагностике вируса ямчатости древесины яблони методом ИСЭМ в качестве экстрагирующего буфера использовали 0,05М Na/K- фосфатный буфер

pH-7,2-7,8 с добавлением 0,01% сульфита натрия и аскорбиновой кислоты. На основании результатов проведённых исследований идентификацию вируса ямчатости древесины яблони методом ИСЭМ предлагаем проводить по следующей схеме:

- Разведение антисыворотки 0,01M Na/K- фосфатным буфером pH-7,2-7,4.
- Покрытие препаративных сеток разведенной антисывороткой и дальнейшее инкубирование при $t+37^0\text{C}$ во влажной камере в течение 30 мин.
- Промывка препаратов 3-мя каплями 0,01M Na/K фосфатного буфера pH-7,2-7,4.
- Перенос сеток на растительный экстракт и инкубация 30 мин при тех же условиях; гомогенизацию растительной ткани проводить с использованием 0,05M Na/K- фосфатного буфера pH-7,2-7,8 с добавлением 0,01-0,02% сульфита натрия и аскорбиновой кислоты.
- Промывка препаратов 0,01M Na/K- фосфатным буфером pH-7,2-7,4 и инкубация на сыворотке того же разведения в течение 30 минут при тех же условиях.
- Промывка препарата 6-8-ю каплями дистиллированной воды и контрастирование 2-3% водным раствором уранилацетата.
- Визуализацию результатов проводить в электронном микроскопе при увеличении 14000 раз.

На рисунке 4.6. представлены декорированные частицы вируса ямчатости древесины яблони, выделенные из яблони.

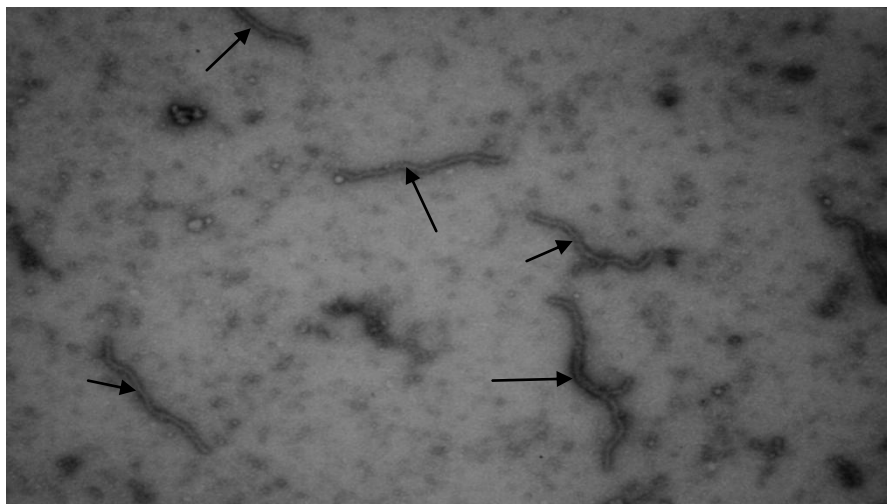


Рис. 4.6. Декорированные частицы ВЯДЯ, выделенные из яблони.

→ Указаны вирусные частицы вируса ЯДЯ. Увл x18000.

Оптимизированная нами методика широко применялась при отборе здоровых клонов, кандидатов в безвирусные клоны, а также в работах по тестированию безвирусных образцов плодовых культур в маточниках категории «Пребазисный», «Базисный» и «Сертификат» [21].

На основании полученных результатов нами составлен календарный план тестирования вируса ямчатости древесины яблони в системе производства безвирусного посадочного материала. Тестирование исходных клонов и ретестирование подвойно-привойных маточников предлагаем проводить в следующие календарные сроки (таб.4.4).

Таблица 4.4. Диагностика ВЯДЯ методом ИСЭМ
по календарным срокам

Исследуемые органы	Месяцы тестирования											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Листья активно растущих побегов					+	+	+					
Лепестки				+	+							
Кора 1-2-летних побегов	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Плоды							+	+	+			

Как видно из данных таблицы 4.4, идентификацию вируса ямчатости древесины яблони методом ИСЭМ по коре одно - двухлетних побегов можно проводить в течение всего астрономического года. По листьям активно растущих побегов тестирование можно проводить с мая по июль, по лепесткам в апреле-мае и по плодам тестирование можно проводить с июля по сентябрь.

Визуализированные нами линейно-агрегированные частицы ВЯДЯ аналогичны данным, полученным [107].

Применение Тритона Х-100 в экстрагирующем буфере привело к раздроблению частиц, но при этом декорирование происходило равномерно и удовлетворительно. Аналогичные данные автором в литературе не обнаружены.

Полученные нами результаты по препарированию ВЯДЯ из тканей пораженных растений плодовых культур согласуются с приведёнными в литературе данными [95].

При этом аналогичных данных по оптимизации календарных сроков и использования поражённых тканей растения для выявления ВЯДЯ в литературе автором не обнаружено.

4.3. Оптимизация метода полимеразно-цепной реакции (ОТ-ПЦР)

Оптимизацию метода ОТ-ПЦР к ВЯДЯ мы проводили совместно с коллегами из Лаборатории вирусологии Института садоводства Украины-доктором сельскохозяйственных наук Удовиченко Екатериной и профессором кафедры вирусологии

Киевского национального университета им. Тараса Шевченко, доктором хабилитат биологических наук Будзанивской Ириной Геннадиевной.

Исследования ВЯДЯ, проведенные совместно с сотрудниками кафедры вирусологии Киевского национального университета им. Тараса Шевченко, проходили в рамках билатерального проекта, финансируемого Центром международных проектов Академии наук Республики Молдова под шифром 10.820.04.04/UA по теме «Молекулярно-биологический анализ вируса ямчатости древесины яблони в коммерческих насаждениях Молдовы и Украины и поиск устойчивых сортов».

Одной из целей нашей совместной работы была отработка метода ОТ-ПЦР к вирусу ямчатости древесины яблони с использованием праймеров, предложенных [90], на примере молдавских изолятов ВЯДЯ.

Используя коммерческий набор для выделения тотальной РНК QIAGEN(UK) мы провели выделение тотальной РНК из заражённых вирусом ямчатости древесины яблони листьев *Nicotiana occidentalis 37B* и плодов *Virginia crab*. Полученные нами результаты по выделению тотальной РНК из-за низкой концентрации не были пригодны для дальнейшей работы по проведению ОТ-ПЦР. Поэтому при дальнейшем выделении тотальной РНК на стадии гомогенизации растительных образцов мы применили жидкий азот. Методика выделения тотальной РНК состояла из следующих этапов:

- 1) 100 мг растительной ткани образца гомогенизировали в ступке в жидком азоте и переносили в стерильный эппендорф;
- 2) добавляли 500 мкл RLT буфера и 5 мкл меркаптоэтанола и инкубировали 2 мин на водяной бане при 56⁰С;
- 3) полученный гомогенат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 2 мин;
- 4) супернатант переносили в пробирку объёмом 2мл и добавляли 220мкл этанола;
- 5) 650 мкл полученной смеси переносили в RNeasy mini колонку и центрифугировали 10000 об/мин в течение 15 секунд;
- 6) добавляли 700 мкл RW1 буфера в колонку и центрифугировали 15 сек 10000 об/мин;
- 7) переносили колонку в новую 2 мл пробирку и добавляли 500мкл RPE буфера и центрифугировали 10000 об/мин-15 сек;
- 8) добавляли 500 мкл RPE буфера в колонку и центрифугировали 13000 об/мин – 1 мин;
- 9) колонку переносили в новую 1,5 мл пробирку, добавляли 35 мкл стерильной воды и центрифугировали 10000 об/мин - 1 мин;
- 10) колонку утилизировали, в эппендорфе оставалась РНК.

Все этапы центрифугирования проводили при температуре 20-24⁰С. Применение жидкого азота позволило нам увеличить количество выделяемой РНК и использовать в дальнейших работах по проведению ОТ-ПЦР (рис 4.7).

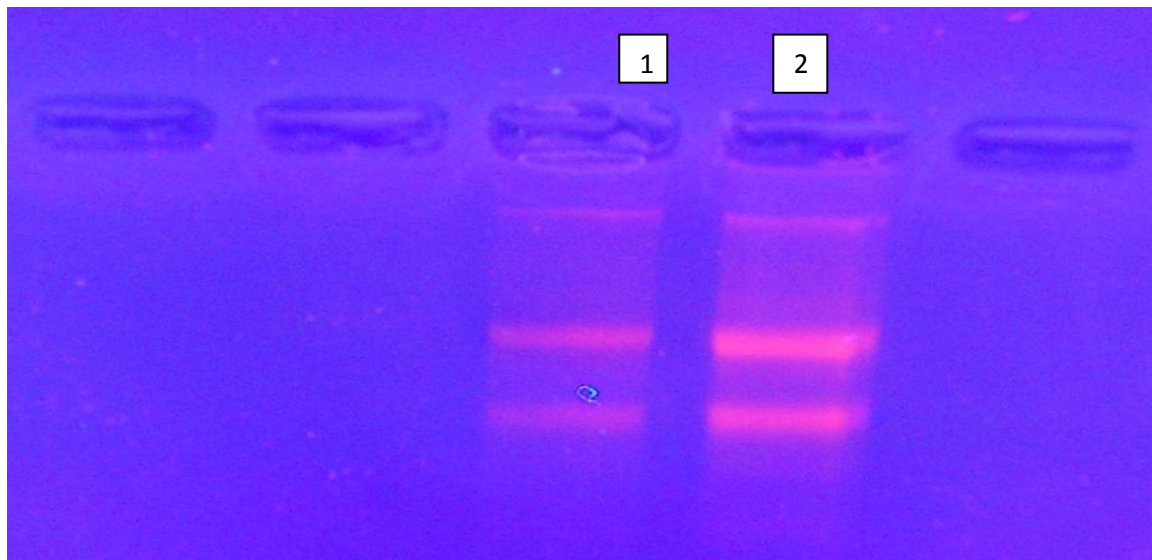


Рис. 4.7. Выделение РНК из образцов с применением жидкого азота.

1-*Nicotiana occidentalis* 37B. 2-*Virginia crab*.

После выделения тотальной РНК мы провели ОТ-ПЦР с применением праймеров, рекомендованных фирмой-производителем диагностического набора, и использованием ПЦР смеси следующего состава:

RT – Mix (PCR buffer DNTP-MgSO₄),

MgSO₄,

Tween20 (5% раствор H₂O деионизированной),

Ribolock RN-каза ингибитор,

Nad-5 sense,

Nad-5 antisense,

Primer Forward – 5′,

Primer Revers – 3′,

H₂O- deionizat,

RT – Tag polimeraz для обратной транскрипции,

образцы РНК,

и применением следующих циклов амплификации:

1-цикл 45 – 60⁰С -15 – 30 мин (обратная транскрипция),

1-цикл 94⁰С время – 2 мин,

40- циклов 94⁰С – 15 сек,

55 – 65⁰С – 30сек,
68⁰С – 1мин,
1-цикл 68⁰С – 5 мин.

Визуализацию результатов ОТ-ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Результаты ОТ-ПЦР отражены на рисунке 4.8.

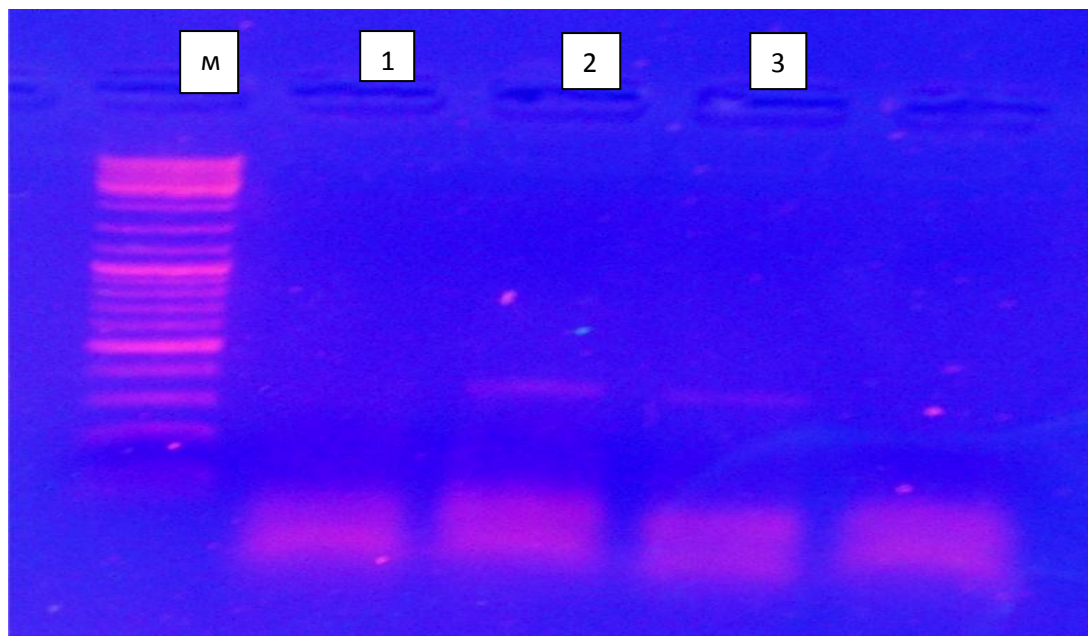


Рис. 4.8. Результаты ОТ-ПЦР, изолятов ВЯДЯ.

Как видно из рисунка 4.8, образцы 2 – 3 показали положительные результаты. Это свидетельствует о том, что в данных образцах нами обнаружен ВЯДЯ.

4.4. Оптимизация метода «IMMUNOCAPTURE» и экономическая эффективность применения метода «IMMUNOCAPTURE».

После получения нами антисыворотки к ВЯДЯ было решено провести выделение антигена (нуклеопротеида) из растительного материала методом «Immunocapture» [130] для дальнейшего использования в проведении ОТ-ПЦР. Совместно с коллегой из Института садоводства, город Киев (Украина), доктором Удовиченко Екатериной [44] мы провели работы по применению метода «Immunocapture» и дальнейшему проведению ОТ-ПЦР.

Разведённую в карбонатном буфере pH-9,6 в соотношении 1:50 сыворотку к вирусу ЯДЯ вносили в эппендорф для проведения ОТ-ПЦР, инкубировали 3 часа при температуре +37⁰С, затем промывали буферным раствором и вносили в эппендорф экстракт заражённых растений, затем инкубировали 12-16 часов в холодильнике при

температуре +4⁰С. После инкубации проводили промывку буферным раствором и вносили ПЦР смесь следующего состава:

RT –Mix (PCR buffer DNTP),
MgSO₄,
Tween20 (5% водный раствор),
Ribolock RN ингибитор,
Nad-5 sense,
Nad-5 antisense,
Primer Forward – 5',
Primer Revers – 3',
H₂O- деионизированная,
RT – Tag полимеразы для обратной транскрипции.

Результаты выделения нуклеопротеида из образцов методом «immunocapture» представлены на рисунке 4.9.

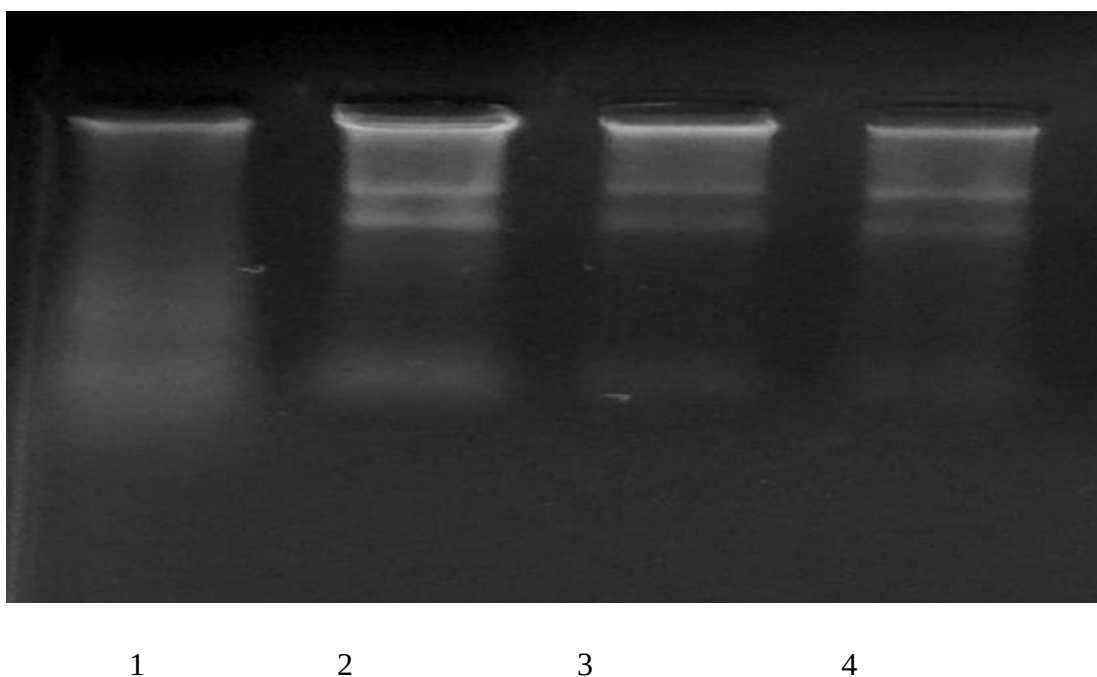


Рис. 4.9. Выделение нуклеопротеида из образцов с применением метода «immunocapture».

1. 10/21 Ренет Симеренко; 2. *Virginia crab*; 3. 3/53/20 *Nicotiana occidentalis* 37B; 4. Morton4/6;

Как видно на рисунке 4.9, нуклеопротеид отсутствует только в образце 1.

Полученные результаты после «immunocapture» мы использовали для проведения ОТ-ПЦР с применением праймеров, предложенных [117].

5' – ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA – 3' (8869-8895).

5' - TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA – 3' (9211-9238).

Использовали следующие циклы амплификации:[130]

1 цикл	95 ⁰ С – 5 мин.
40 циклов	94 ⁰ С – 30 сек, 55 ⁰ С – 40 сек, 72 ⁰ С – 1 мин.
1 цикл	72 ⁰ С – 10 мин.

После окончания амплификации проводили охлаждение до +4⁰С и далее проводили горизонтальный гель-электрофорез для визуализации результатов. Результаты электрофореза представлены на рисунке 4.10.

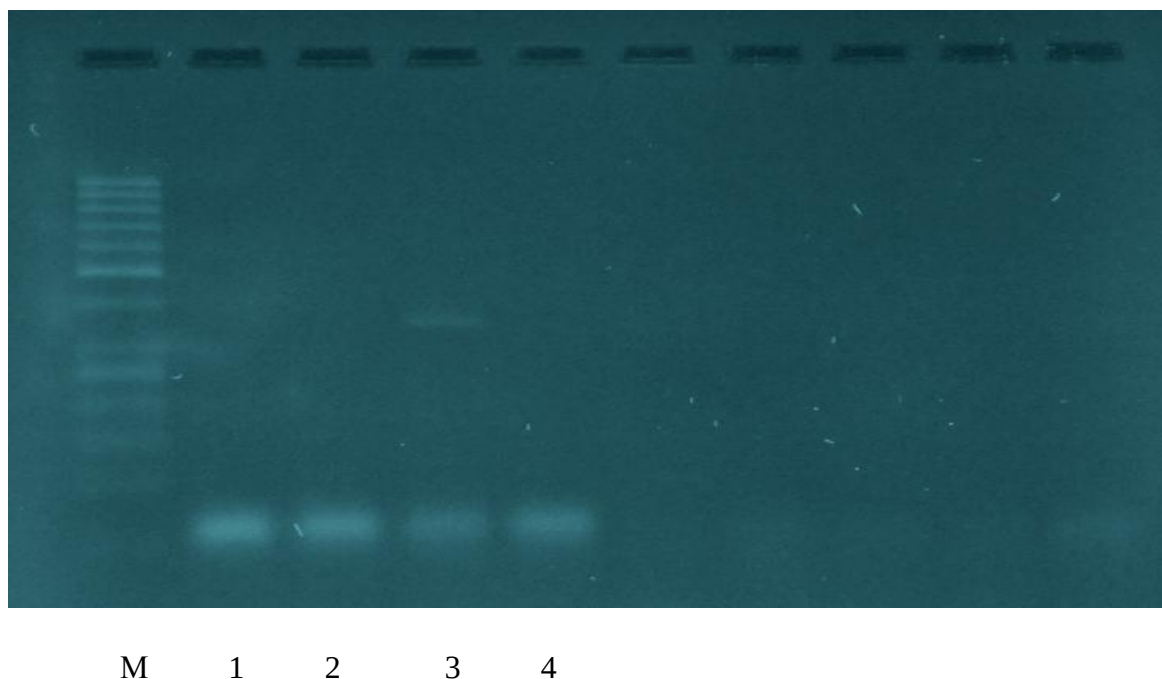


Рис. 4.10. Результаты ОТ-ПЦР с применением метода «immunocapture».

Наш фрагмент 370 п. о. в дорожке №3 и является образцом 3/53/20 ВЯДЯ, выделенным из *Nicotiana occidentalis* 37В .

Мы использовали Маркер Thermo Scientific 50bp: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 п. о.

Использование метода «immunocapture» показало, что для проведения качественной реакции ПЦР не обязательно использовать кит для выделения тотальной РНК.

Нами был проведен расчёт экономической эффективности проведения выделения нуклеопротеида с применением метода «immunocapture». Данные стоимости наборов взяты у коммерческих фирм-производителей Bioreba [61] и Qiagen [135].

Так, набор для выделения тотальной РНК фирмы Qiagen RNeasy Mini Kit на 50 выделений стоит 285,72 \$ США. (13.09.2015). Курс доллара по отношению к лею составляет 19.54 лея за 1 доллар.

Sku	Name	Available	Price
 74104	RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen) View Detail	Add to Order 12	\$285.72
 74134	RNeasy Plus Mini Kit (50) (Qiagen) View Detail	Add to Order 11	\$326.19
 74004	RNeasy Micro Kit (50) (Qiagen) View Detail	Add to Order 10	\$452.45
 RTN70-1KT	GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit, 70 Preps (Sigma-Aldrich) View Detail	Add to Order 2	\$288.51
 74106	RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen) View Detail	Add to Order <i>Delivered in 3 to 5 days (estimated)</i>	\$1,273.19
 K0731	GeneJET RNA Purification Kit - 50 Preps (Thermo Fisher Scientific) View Detail	Add to Order 2	\$228.16

Отношение курсов валют составляет 21.56/19.54 и равняется 1.103.

Таким образом, 285.72\$ США равняется 259.03 Евро.

Стоимость одного выделения составляет 5.18 Евро или 111.68 лей.

Стоимость сета иммуноглобулинов IgG на 500 выделений составляет 113 Евро (13.09.2015). Курс евро по отношению к Молдавскому лею составляет 21.56 лей за 1 евро.

Pathogen: Apple stem pitting virus

Abbr: ASPV

[more info](#)

Art. No.	Reagent form	Size	Assays	Price EUR
151812	IgG	0.2 ml	1000	194.00
151822	Conjugate	0.2 ml	1000	232.00
151862	Reagent set	1 set	960	464.00
151872	Complete Kit	1 kit	960	562.00
151815	IgG	0.1 ml	500	113.00
151825	Conjugate	0.1 ml	500	135.00
151865	Reagent set	1 set	480	275.00
151875	Complete Kit	1 kit	480	340.00

Стоимость одного выделения составляет 0,226 Евро или 4.87лей.

Исходя из представленных данных, экономическая эффективность применения метода immunocapture составляет разницу в 22.9 раза. Таким образом, выделение нуклеопротеида с применением метода immunocapture в 22.9 раза дешевле, чем выделение тотальной РНК с применением коммерческих наборов.

Результаты, полученные нами при выделении тотальной РНК из заражённых тканей с применением набора для выделения коммерческой фирмы Qiagen, и использование жидкого азота аналогичны данным полученным [43, 108, 117].

Выделение нуклеопротеида методом «immunocapture» с применением поликлональной антисыворотки к исследуемому вирусу в разведении 1:50 дало положительные результаты, аналогичные данные в литературе автором не обнаружены.

Подсчёты экономической эффективности проведения выделения нуклеопротеида с применением метода «immunocapture» и с применением наборов коммерческих фирм-производителей Bioreba [61] и Qiagen [135] указывают на целесообразность применения данного метода и аналогичны [140].

4.5. Выводы к главе 4.

1. Применение сорбентов Сефарозы CL-4B и BrCN активированной сефарозы для выделения фракции IgG позволило получить иммуноглобулины с высокой концентрацией.
2. Приготовлены диагностические наборы для оптимизации метода ИФА.
3. Разведение иммуноглобулинов в концентрации 1:1000, конъюгата 1:750, растительного сока 1:10 и проведение трёхстадийного ИФА дало наилучшие показания экстинции.
4. Применение двухстадийного ИФА для диагностики ВЯДЯ не дало положительных результатов.
5. Определены оптимальные сроки проведения ИФА в системе производства безвирусного посадочного материала с указанием календарных сроков и тканей растения для проведения анализа.
6. Оптимизирован метод иммуносорбентной электронной микроскопии, определены оптимальные сроки проведения ИСЭМ в системе производства безвирусного посадочного материала с указанием календарных сроков и тканей растения.
7. Оптимизирован метод полимеразной цепной реакции для диагностики ВЯДЯ.
8. Проведено выделение нуклеопротеида из растительного сока методом «immunocapture» с применением антител собственного производства.
9. Проведен расчёт экономической эффективности выделения нуклеопротеида с применением метода «immunocapture». Экономическая эффективность применения «immunocapture» составляет 22.9 раза.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Общие выводы

1. Выявлены и идентифицированы вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони для определения реакции переноса на травянистые индикаторы, накопления вирусных частиц, очистки и использования в дальнейших работах.
2. Получен очищенный препарат вируса ямчатости древесины яблони, и приготовлены высокоспецифические антисыворотки с активностью антител при разведении 1:1800; 1:2048.
3. Оптимизирован метод диагностики вируса ямчатости древесины яблони методом иммуноферментного анализа. Для практических целей рекомендован «сэндвич» – вариант иммуноферментного анализа со следующими режимами проведения: а) инкубирование иммуноглобулинов 3 часа при $t^0+37^0\text{C}$; б) инкубирование тестируемых образцов 3 часа при $t^0+37^0\text{C}$; в) инкубирование конъюгата 3 часа при $t^0+37^0\text{C}$.
4. Установлено, что оптимальным для достоверного обнаружения вируса ямчатости древесины яблони было разведение иммуноглобулинов в соотношении 1:1000; разведение конъюгата 1:750 и разведение растительного экстракта плодовых растений 1:10.
5. Усовершенствован и предложен метод диагностики вируса ямчатости древесины яблони методом иммуносорбентной электронной микроскопии, подобраны условия и календарные сроки тестирования вируса ямчатости древесины яблони данным методом.
6. Оптимизирован метод полимеразной цепной реакции для диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Впервые в Молдове отработан метод «immunocapture» для выделения нуклеопротеида из растительного экстракта, что позволило существенно повысить рентабельность метода.
7. Проведен расчёт экономической эффективности применения метода «immunocapture» с использованием антисыворотки собственного производства. Применение метода «immunocapture» удешевляет выделение нуклеопротеида в 22.9 раза.
8. Разработанные, усовершенствованные и оптимизированные методы применены в системе сертификации посадочного материала семечковых культур в Республике Молдова.

Практические рекомендации

1. Произведённая высокоспецифичная антисыворотка к вирусу ямчатости древесины яблони и приготовленный на её основе диагностический набор рекомендованы для применения в плодовом питомниководстве при получении исходных клонов, тестировании и ретестировании маточных насаждений, а также при контроле фитосанитарного состояния производимых саженцев яблони, согласно системе сертификации посадочного материала, принятой в Республике Молдова.
2. Рекомендованы для диагностики вируса ямчатости древесины яблони два иммунологических метода диагностики ИФА и ИСЭМ. Рекомендованы календарные сроки их применения для диагностики вируса ямчатости древесины яблони с использованием органов и тканей растения.
3. Впервые в Молдове оптимизирован и рекомендован для использования в работах по получению безвирусных клонов и тестирования вируса ямчатости древесины яблони молекулярно-генетический метод ОТ-ПЦР.
4. Рекомендовано проведение выделения нуклеопротеида из экстракта методом «immunocapture». Данный метод ОТ-ПЦР будет использоваться при тестировании исходных безвирусных клонов. Применение оптимизированных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони позволит ускорить процесс перевода плодового питомниководства Республики Молдова на безвирусную основу.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Calășean I. ș. a. Pepinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. În: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, Chișinău, 2012, nr 2, p. 9-10.
2. Coman T., Gheorghiu E., Minoiu N. Gradul de infecție cu virusuri a principalilor portaltoi de măr. În: Culegere de lucrări științifice Institut pentru Pomicultură, Pitești, 1973, vol. I, p. 379-385.
3. Hotărîrea Guvernului nr. 390 din 29 aprilie 1997 „Cu privire la aprobarea Regulilor de desfacere către populație a semințelor, răsadului și materialului săditor horticol” În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 1997, nr 35-36, art.389.
4. Hotărîrea Guvernului nr. 415 din 21.06.2013. Pentru aprobarea Normei privind producerea, controlul, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire și de plantare fructifer. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 28.06.2013, nr. 136-139.
5. Legea Republicii Moldova cu privire la pomicultură Nr.728-XIII din 06.02.96. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 21.03.1996, nr.17-18/188.
6. Minoiu. N. Cercetări asupra virusului strierii lemnului la măr. (Apple stem pitting). În: Culegere de lucrări științifice Institut pentru Pomicultură, Pitești, 1977, vol. I, p. 205-210.
7. Бивол Т.Ф. Изучение латентных вирусов яблони в Молдавской ССР и фитосанитарный отбор как метод получения безвирусного посадочного материала: Автореферат диссерт. канд. с/х наук. Кишинёв, 1978. 35 с.
8. Бивол Т.Ф. Латентные вирусы яблони и их изучение в Молдавской ССР. В: Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. Выпуск 1. Кишинёв, 1973. с. 32-65.
9. Бриндаров Д. Д. Диагностика вирусных болезней яблони. Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук. Москва, 2005. 223 с.
10. Вердеревская Т.Д., Х. Кеглер. Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии. Кишинёв, 1980, с. 3-10.
11. Вердеревская Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и разработка мер борьбы с ними в Молдавской ССР. Автореф. докт. дис. Кишинев, 1973. 45 с.
12. Вердеревская Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур. Кишинев: Штиинца, 1981. 174 с.
13. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев, Штиинца, 1985, с.130-150.
14. Вердеревская Т.Д., Рудь, Г.Я. Вирусные заболевания плодовых культур и винограда и пути решения проблемы создания свободных от вирусов насаждений. В: Доклады семинара ФАО стран средиземноморья по защите плодовых и винограда от вредителей и болезней. Москва, 1969, с. 11-18.

15. Глик Б. Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М: Мир, 2002. 589 с.
16. Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. Москва: Наука, 1985. 184 с.
17. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Агропромиздат, Москва, 1985, с. 185-188.
18. Калашян Ю. и др. Создание и содержание безвирусного генофонда семечковых пород в Республике Молдова. В: Материалы VII Международной конференции по теме: «Биоресурсы и вирусы», Киев, (Украина), 2013, с. 73.
19. Калашян Ю. и др. Вирус ямчатости древесины яблони в Молдове. В: Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, 2012, пр. 62. с. 61-64.
20. Калашян Ю.А., Липартия З.М. Изучение возможности диагностики вируса хлоротической пятнистости листьев яблони методом иммуноэлектронной микроскопии. В: Вирусные заболевания культурных растений в Молдавии. Кишинёв, 1984, с. 97-99.
21. Калашян Ю.А., Рапча М.П. Организация производства сертифицированного посадочного материала в Республике Молдова. В: Материалы IV Международной конференции по теме: «Биоресурсы и вирусы». Киев, 2004, с. 79-80.
22. Калашян Ю. и др. Фитосанитарный контроль в системе сертификации плодового питомниководства. В: *Protectia plantelor, realizari si perspective*, Chisinau, 2004, р. 78-79.
23. Кухарчик Н. В. Вирусные и микоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси. Минск: 2012. 209. с.
24. Петерсон Л. и др. Некоторые данные о корневой прививке карельской берёзы с яблоней *Virginia crab*. В: Вредители и болезни с/х растений и меры борьбы с ними. Елгава. 1972, Ч.1, с. 29-32.
25. Петерсон Л., Витола Р., Дрейманис Э. Карельская берёза и вирусная ямчатость плодовых. Вредители и болезни с/х растений и меры борьбы с ними. В: Труды ЛСХА, 1972, ч.16, вып. 69, с. 51-54.
26. Приказ об утверждении Технического регламента по производству, тестированию, сертификации и реализации материала для размножения и посадочного материала плодовых и ягодных культур Nr. 198 от 22.08.2005. В: *Monitorul oficial al Republicii Moldova* din 24.03.2006, пр. 47-50/168.
27. Проданюк Л.Н. Обследование коллекции яблони научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий на наличие вируса ямчатости древесины яблони. В: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*. 2014. nr. 3 [51]. p 8-9.
28. Проданюк Л.Н. Диагностика вируса ямчатости древесины яблони методом полимеразно-цепной реакции. В: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, 2015, пр. 5-6, р. 42-43.

29. Проданюк Л.Н. и др. Оценка зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами в коллекции Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий. В: Плодоводство и ягодоводство России, 2013, Том XXXVI, часть 2, с. 110-111.
30. Рапча М.П., Калашян Ю.А. Пути перевода плодового питомниководства республики Молдова на безвирусную основу и международные нормы сертификации. В: Materialele Conferinței științifico-practice internațională, consacrate jubileului de 90 de ani de la fondarea I.C.P. Chișinău, 2000, p. 142-146.
31. Саунина И.И. Вредоносность латентных вирусов на груше и их диагностика методами ИФА и ПЦР. Автореферат диссер. канд. с/х наук. Москва, 2009. 27 с.
32. Сироткин Е.Н. Распространённость латентных вирусов на клоновых подвоях яблони в ЦЧ России. В: АГРО XXI, 2012, нр. 4-6, с. 19-21.
33. Скрипник Н.В., Бондаренко П.Е., Чернега Н.П. Получение свободного от вирусов подвойного и привойного материала груши. 2013, нр. 7, с. 95-99.
34. Татаринов А.Н. Вредоносность гутаперчивости и вирусных болезней яблони. В: Садоводство и Виноградарство. 1994, нр. 5-6, с. 10-11.
35. Тулеуов Ж.Г., Исин М.М. Вирусные болезни плодовых. Алма-Ата, 1976, нр. 6, с. 62-64.
36. Тулеуов Ж. О выращивании безвирусного посадочного материала яблони. В: Методы ускоренного размножения плодовых, ягодных культур и винограда. Алма-Ата, 1977, с. 75-81.
37. Упадышев М. Т., и др. Распространенность вирусных болезней плодовых и ягодных культур и современные методы борьбы с ними. В: Живые и биокосные системы. 2014, нр. 9, с. 22-25.
38. Упадышев М.Т., Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур. Автореферат докторской диссертации, Москва, 2011, 45 с.
39. Упадышев М.Т., Метлицкая К.В. Диагностика латентных вирусов семечковых культур в Московской области. В: Науч. труды ГНУ СКЗНИИСиВ. 2013, Том 2, с. 75-78.
40. Упадышев М. Т. и др. Технология получения здорового от вирусов материала плодовых и ягодных культур. В: Методические указания. Москва, 2013, 92 с.
41. Шагапов Р.Ш. Вирусные заболевания яблони и разработка мер борьбы с ними в Таджикистане. Автореферат диссертации, Кишинёв, 1993, 18 с.
42. Будзанівська І.Г., Поліщук В.П., Філогенетичний аналіз РНК вмісних вірусів рослин, що циркулюють на території України. ПП Формат, 2014, 225 с.
43. Господарик А. В. Молекулярно-біологічні властивості українських ізолятів латентних вірусів яблуні. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Київ, 2009, 23 с.

44. Удовиченко В.М. Моніторинг латентних вірусів яблоні в Україні. Садівництво, 2005, nr. 57, с. 503-508.
45. Трифонов Д. Етиологична връзка между болестите вджуджаване на *Malus platycarpa* Rehd (*Platycarpa draft*) и жлебове по стъблото на ябълката (apple stem pitting). В: Раст. Защита в помощ на селското стопанство. София, 1970, с. 45-49.
46. Трифонов Д. Жлебове бразди пе стеблото на ябълката (apple stem pitting). В: Растителната защита в помощ на селското стопанство. София, 1970, с. 57-66.
47. Akius M., Westrom B. Apple chlorotic leaf spot virus. Purification, immunization and characterization. In: Vaxtskddsnotiser. 1984, vol. 47, nr. 5-6, p. 74-78.
48. Anderson F.A., Stenley W.M. A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. In: J. Biol. Chem. 1941, nr.139, p. 339-344.
49. Arntjen A., Jelkmann W. Investigation of virus occurence in different tissues throughout the year and sequeunce variability of Apple stem pitting virus. In: 21 st. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kuhn-Archiv, 2010, nr. 427, p. 118-121.
50. Atanasoff D. Virus stem pitting of birch fur Pflanzenkrankh. In: Pflanzenpath und Pflanzenschutz Band. 1967, nr. 74(4), p. 105-109.
51. Atkinson J.D. Green crinkle shown in New Zealand apple trees. In: The Orchardist of New Zealand. 1946, nr. 19(5), p. 10-11.
52. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigens and antibodies. In: Immunochemistry, 1969, nr. 6, p. 43-52.
53. Ball E.M., Brakke M.K. Leaf-dif serology for electron microscopic identification of plant viruses. In: Journal Gen. Virology, 1968, vol. 36(1), p. 152-155.
54. Barba M. Virus Certification of Fruit Tree Propagative Material in Western Europe. In: Plant Virus Disease Control (edited by A.Hadidi, R.K.Khetarpal, H.Koganezawa) APS Press, St.Paul, Minnesota, 1998, p. 288-293.
55. Bar-Joseph M., Murrant A.F. Closterovirus group A. B. In: Discription of plant viruses. 1982, nr. 260.
56. Barrat J. G., Smith W. W., Rich A. R. The occurrence of stem-pitting and dapple apple virus disorders in an orchard propagated with known sources of varietal scionwood. In: Plant Dis. Rept. Sup. 1959, nr. 254, p. 8-12.
57. Barrat J. G., Smith W. W., Rich A. R. Transmission of the dapple apple virus. (Abstract). In: Phytopathology. 1958, nr. 48, p. 260.
58. Barrat J.G., Mircetich S.M., Fogle H.W. Stem pitting of peach. In: Plant Diseasses Rept, 1968, nr. 52(2), p. 91-94.

59. Baumann G., Lemmich H. Das Stammnarben-Virus (Stem pitting) des Apfels in Deutschland. In: Erwerbsobstbau, 1965, nr. 7, p. 123-126.
60. Bercks R. Methodische Untersuchungen Über den serologischen Nachweis pflanzenpathogener viren mit dem Bentonit-Flockung-test, dem Latez-test und dem Bariumsulfat-test. In: Phytopath. Z. Bd, 1967, nr. 58, p. 1-17.
61. Bioreba.http://www.bioreba.com/popup.php?docFile=http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/ELISA_Reagents/ASPV_DAS_ELISA.pdf vizitat (28.08. 2015).
62. Brandes J. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stabchen formiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkeimen. Nachrichtenbl. Dtsch. In: Pflanzenschutzdienst, 1957, Bd.9, p.151-152.
63. Cameron H.R. Stem pitting of Italian Prune. In: Plant. Disease Repr, 1969, nr. 53(I), p. 4-6.
64. Catalog.<https://www.uoftmedstore.com/catalog.sz?parent=12990> vizitat: (28.08. 2015).
65. Cation D. Dwarf fruit and tree decline, a virus disease of apple. In: Michigan Agr. Expt. Sta. Quart. Bul, 1960, nr. 42, p. 722-727.
66. Certification scheme. Virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. Part III: testing methods for viruses of fruit trees present in the EPPO region. In: EPPO Bulletin, 1992, nr. 22, p. 265-277.
67. Chernets A., Kalashian I. Thermo-therapy of apple cultivars infected by the complex of latent viruses. In: Conference "Applied plant biotechnology" Lednice, Czech Republic, 2012, p.25-27.
68. Christoff A., Mosaikfleckigkeit, Chlorose und Stippenfleckigkeit bei Äpfeln und Quitten. In: Phytopath. Z, 1935, nr. 8, p. 285-296.
69. Civerolo E.L., Mircetich S.M. Prunus stem pitting disease. In: IX European Symp. On fruit tree virus dis. East.Mall.Res. Sta.Kent, 1973, vol. 58, p. 553-555.
70. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. In: Jour. Gen.Virology, 1977, vol. 34, p. 475-483.
71. Clark M.F., Adams A.N., Barbara D.J. The detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: Acta Horticulturae, 1976, vol. 67(1), p. 43-49.
72. Clark M.F., Bar-Joseph M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. In: Methods in virology. (Eds) K. Maramorosch, A. Kaprowski, N.Y. Academic press. 1984, p. 51-85.
73. Derrick K.S. Immuno-specific grids for electron microscopy of plant viruses. In: Phytopathology, 1972, vol. 62, nr. 4, p. 753-754.
74. Derrick K.S. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology, 1973, vol. 56, nr. 2, p. 652-653.

75. Dhir S. et al. Molecular evidence for Apple stem pitting virus infection in India. In: Plant pathology, 2010, vol. 59, p. 393.
76. Diamalla G., Milbrath I.A. The prevalence of latent viruses in Oregon apple trees. In: Pl. Dis. Repr., 1965, vol. 49, p. 15-18.
77. Engvall E., Perlmann P. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: Journal Immunochem, 1971, vol. 8(4), p. 871-874.
78. EPPO certification scheme for fruit trees, including almond. In: Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 06/2008, vol. 27(4), p. 571 - 579.
79. F.A. van der Meer. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. In: Akta Horticulturae, 1986, nr. 193, p. 73-74.
80. Fridlund P.R., Aichele M.D. Reaction of Crab Apples considered As. Potential Apple Pollinizers to Latent virus infection. In: Fruit Varieties Journal, 1987, vol. 41(I), p. 17-18.
81. Fuch E. Vergleich verschiedener serologischer Methoden zum Nachweis des Stammfurchungs – Virus des Apfels (SGV) und Chlorotischen Blattfleckungs virus. In: Arch. 1983. vol. 31(5), p. 237-245.
82. Gardner F.E., Marth P.C., Magness J.R. Lethal effects of certain apple scion on Spy 227 Stock. Americ. Soc. In: Hort. Sci. Proc, 1946, nr. 48, p. 195-199.
83. Guengerich H.W., Millikan D.F. Reaction of own-rooted trees of SPY-227 and Virginia Crab to infection with the stem pitting virus. In: Plant Disease Repr, 1959, nr. 254, p. 30-31.
84. Guengerich H.W., Millikan D.F. Tolerance of some hardy apple stocks to the stem pitting virus of apple. In: Plant Disease Repr, 1959, nr. 254, p. 35-36.
85. Guengerich H.W., Millikan D.F. Transmission of the stem pitting factor in apple. In: Plant Disease Repr, 1956, nr. 40, p. 934-938.
86. Gugerli, P., Ramel, M.E., Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of apple stem pitting and pear yellow vein viruses in apple and pear. In: XIX International Symposium on Virus and Virus – Like Diseases of Temperate Fruit Crops – Fruit Tree Diseases. ISHS Acta Horticulturae, 2004, nr. 657.
87. H. J. Van Oosten. Purification of plum pox (Sharka) virus with the use of Triton X-100. Neth.J. In: Plant Pathology, 1972, nr. 78, p. 33-44.
88. Hatton R.G. Plum rootstock studies their effect on the vigour and cropping of the scion variety. In: J. Pomology, 1936, vol. 14(97), p. 136-138.
89. James D.Sharon., et al. Identification and Differentiation of Prunus Virus Isolates that Cross-React with Plum Pox Virus and Apple Stem Pitting Virus Antisera. In: Plant Disease, 1996, vol. 80 (5), p. 536-542.

90. Jelkmann W. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex and carlaviruses. In: Journal of General Virology, 1994, vol. 75, p. 1535-1542.
91. Jelkmann W., Keim- Konrad R. An immunocapture-polimerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. In: J. Phytopathology, 1997, vol. 145, p. 499-504.
92. Jelkmann W., Kunze L., Vetten H.J., Leseman D.E. CDNA cloning of DSRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus – like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. In: ISHS Acta Horticulturae 1991, nr. 309.
93. Jones A.L., Stem pitting of stone fruits. In: Jn. Diseases of tree fruits in Michigan Extens. Bull.E-714, 1971, p. 28-29.
94. Julianna Frietas-Astua. et al. Identity of Apple stem pitting virus in Sao Paulo, Brazil, confirmed by RT-PCR. In: Fitopatol. Bras, 2004, vol. 29, nr. 6, p. 45-58.
95. Kalashian Y.A., Zemchic E.Z., Bondarenko N.P. Isolation, preparation of antisera and immunodiagnosis of apple stem pitting virus. In: International Conference Fundamental and applied problems in phytovirusology. Ukraine, Crimea, Yalta, 1994, p. 51.
96. Kalashyan Yu. et al. Plum hybrids susceptibility to sharka in the conditions of Moldova. In: The X international Congress of Geneticists and Breeders. Republic of Moldova, Chisinau, 2015, p. 84.
97. Kalashyan Yu. et al. The Cherry Leaf Roll Virus (CLRV) on Walnut in the Republic of Moldova. In: ВІСНИК Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 2011, nr.59, с. 14-15.
98. Kalashyan Yu. et al. The phytosanitary certification system of the fruit tree nurseries in Moldova. In: Information bulletin IOBS EPRS, 2014, nr. 46, p. 54-56.
99. Kegler H., Verderevskaia T.D., Proll E., Arch. Phytopath. In: Pflanzenschutz, Berlin, 1977, nr. 13, p. 297-310.
100. Kerlan C., Mille B., Dunez J. Immunoelectronmicroscopy for virus detection and virus strain identification. In: Acta Horticulturae, 1983, nr. 130, p. 173-179.
101. Klerks M.M. et al. Rapid and Sensitive Detection of Apple stem pitting virus in Apple Trees Through RNA Amplification and Probing with Fluorescent Molecular Beacons. In: Phytopatology, 2001, nr. 91, p. 1085-1092.
102. Koenig K. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. In: Gen. Virol, 1978, vol. 40, nr. 2, p. 309-318.
103. Koganezawa H. and Yanase H. A New Type of Elongated Virus Isolated from Apple Trees Containing the Stem Pitting Agent. In: Plant Dis, 1990, nr. 74, p. 610-614.

104. Komorowska B., Malinowski T. The attempts, to produce antiserum against apple stem pitting virus coat protein [ASPV CP] obtained in prokaryotic and eukaryotic expression systems. In: Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 2009, vol. 17, nr. 2. p. 21-30.
105. Kristensen H. List of Fruit Tree Virus and Mycopl. In: Dis.Kyngby (Denmark), 1979, nr. 30, p. 55-57.
106. Kundu J.K. Detection, Distribution and genetic diversities of apple stem pitting virus and apple stem grooving virus in the Czech Republic. In: XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases. ISHS Acta Horticulturae, 2008, nr. 781, p. 572-574.
107. Kundu J.K., Duchacova M., Jokes M. Cytopathology of Apple stem pitting virus in *Nicotiana occidentalis*. In: Biologia, Bratislava, 2006, vol. 61, nr. 4, p. 469-471.
108. Kundu J.K., The occurrence of Apple stem pitting virus and Apple stem grooving virus within field-grown apple cultivars evaluated by RT-PCR. In: Plant Prot. Sci., 2003, vol. 39, nr. 3, p. 88-92.
109. Kundu J.K., Yoshikawa N., Apple stem pitting virus. Molecular characterization of plant viruses. Houston, Texas, USA, In: Studium Press, 2008, p. 215-217.
110. Kundu Jiban Kumar. The Application of RT-PCR Assay for the Detection of Apple Stem Pitting Virus and Apple Stem Grooving Virus in Four Apple Cultivars. In: Plant protection Science, 2002, vol, 38, nr. 1, p. 13-17.
111. Leone G. et al. Symptoms on Apple and Pear indicators after back-transmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of apple stem pitting virus with pear vein yellows virus. XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops. In: Acta Horticulturae, 1998, nr. 472, p. 61-65.
112. Lott T.B., Keane W.L., May J., Gumming, distortion and pitting in cherry and apricot. Can. In: Plant. Dis. Survey, 42, 1962, p. 229-232.
113. Malinowski T., Komorowska B., Golis T. Detection of Apple stem pitting virus and pear vein yellows virus using reverse transcription- polymerase chain reaction. In: Acta Horticulturae, 1989, vol. 472, p. 87-95.
114. Mathioudakis M.M., et al. First report of the apple stem pitting virus (ASPV) in Quince in Greece. In: Journal of Plant Pathology, 2006, vol. 88, nr. 2, p. 225-229.
115. Mc Crum R.C. Observations in Maine Stem pitting a virus disease of apple. In: Plant Disease Repr, 1959, nr. 254, p. 3-7.
116. Mc Crum R.C. Transmission of apple mosaic and stem pitting viruses through root grafts. In: Phytopathology, 1962, vol. 52, nr. 9, p. 925.

117. Menzel W., Zahn V., Maiss E. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. In: *Journal. Virol. Meth*, 2003, vol. 110, p. 153-157.
118. Milne R.G., Immune electron microscopy of virus preparations. In: *Methodes in Virology*. Academic Press, 1977, p. 265-267.
119. Milne R.G., Luisoni E. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. In: *Virology*, 1975, vol. 65, nr. 2, p. 270-274.
120. Milne R.G., Luisoni E. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: *Methods in Virology*. London; Academic Press, 1977, p. 265-281.
121. Minoiu N., et al. Investigations on pear vein yelloows in nursery. In: *Akta Horticulturae*, 1986, nr. 193, p. 89-91.
122. Mircetich S.M., Civerolo E.L. Relationship between stem pitting in Peach and in other *Prunus* species. In: *Phytopathology*, 1972, vol. 62, nr. 11, p. 1294-1302.
123. Mircetich S.M., Fogle H.W. Stem pitting in *Prunus* spp. Other than peach. In: *Plant Diseases Reprtr*, 1969, vol. 53, nr. I, p. 7-11.
124. Mircetich S.M., Fogle H.W., Civerdo E.L. Peach stem pitting transmission and Natural Spread. In: *Phytopathology*, 1970, vol. 60, nr. 9, p. 1329-1334.
125. Montgomery H.B.S., Moore H.H., Hoblyn T.N. A field trials of measures designed for the control of bacterial canker of Victoria plum trees. In: *Rep.E.Mall. Res.Sta for*, 1942, p. 53-61.
126. Mosse B., Garner J. Growth and Structural Changes induced in Plum by an additional Scion. In: *Journal of Horticult. Sci*, 1954, vol. XXIX, nr. I, p.12-20.
127. Mullis K.B., Faluna F.A. In methods in enzimology. In: *Academic Press. London*, 1987, vol. 155, p. 335 - 350.
128. Na Liu., Jianxin Niu. Cloning and Prokaryotic Expression of Apple Stem Pitting Virus CP Gene in Ya Pear in *E. coli*. In: *Molecular Pathogens*, 2011, Vol. 2, nr. 5, p. 98-102.
129. Na Liu., Jianxin Niu., Ying Zhao. Complete genomic sequence analyse of Apple stem pitting virus isolates from China. *Virus Genes*. In: *Academic Journal*, 2012, vol. 44, nr. 1, p. 124-130.
130. Nemchinov L., Hadidi A., Faggioli F. PCR-detection of apple stem pitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates. In: *Acta Hort*, 1998, nr. 472, p. 67-73.
131. Nemeth M. *A gyumolcsfek virusbetegsegel*. Budapest, 1961, 296 p.
132. Posnette A.F. Virus diseases of apples and pears. In: *Commonwealth Agric. Bureaux*, 1963, nr. 30, p. 47-51.
133. Posnette A.F. Virus diseases of pears in England. In: *Journal Hort. Sci.*, 1957, nr. 32, p. 53-61.
134. QIAGEN. *One Step RT-PCR Kit Handbook*. Qiagen, 2002, 39 p.

135. Radaelli Paula. et al. Biological and molecular diagnosis and nucleotide sequence analysis of the coat protein gene of an isolate of Apple stem pitting virus. In: Fitopatol. Bras., 2006, vol. 31, nr. 1, p. 51-56.
136. Regenmortel M.H.V. Serology and Immunochemistry of plant viruses. In: Academic Press Inc, 1985, nr. 4, p. 302.
137. Rich A.E. Influence of apple stem pitting viruses on tree growth and fruit yields over a fourteen year period. In: Plant Dis. Repr., 1967, p. 51.
138. Rich. A. E. Natural spread of stem pitting virus of Apple. In: Plant Disease Rept, 1967, nr. 51, p. 4.
139. Rodoni B.C., Constable F.E. The incidence and strain variation of apple stem grooving and apple stem pitting viruses in Australian pome fruit. XX International Symposium on Virus and Virus – Like Diseases of Temperate Fruit Crops – Fruit Tree Diseases. In: ISHS Acta Horticulturae, 2008, nr. 781, p. 167-174.
140. Rossini M. N., Giayetto A. L. and D. L.Vera. First Report in Argentina of Apple stem pitting virus Causing Pear Vein Yellows Disease in Pear. In: The American Phytopathological Society, 2010, vol. 94, nr. 4, p. 488.
141. Salmon M., Veldrame Marina. Rapid and homogenous detection of Apple Stem Pitting virus by RT-PCR and a Fluorogenic 3' minor groove binder DNA probe. In: European Journal of Plant Pathology, 2002, nr. 108, p. 755-762.
142. Sedlak J. F., Paprstein L. Talascko. Elimination of Apple stem pitting virus from pear cultivars by in vitro chemotherapy.. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Micro and Macro Technologies for Plant Propagation and Breeding in Horticulture. In: Acta Horticulturae, 2010, nr. 923.
143. Smith S.H., Stouffer R.F. Isolation of tomato and tobacco ring spot viruses from soil around stem pitted Prunus trees. In: Phytopathology, 1970, vol. 60, nr. 6, p. 1017-1018.
144. Smith W. Occurrence of stem pitting and necrosis in some body stocks for apple trees. Proc. Amer. Soc. In: Hort. Sci., 1954, nr. 63, p. 101-103.
145. Stouffer R.F., Levis F., Soulen D.M. Stem pitting in commercial cherry and plum orchard in Pennsylvania. In: Plant Diseases Repr, 1969, vol. 53, nr. 6, p. 434-438.
146. Stouffer R.F., Soulen D.M., Smith S.H. Spread and control of Prunus stem pitting. In: Acta horticulturae, 1975, nr. 44, p.107-112.
147. Thornberry H.H. Peach stem pitting in Illinois. In: Plant Dis.Repr, 1970, vol. 54, nr I, p. 67-68.
148. Tukey R.B., Klackle R.L., McClintock J.A. Observations on the incongeniality between some scion varieties and Virginia crab stocks. Proc. Amer. Soc. In: Hort. Sci, 1954, nr. 64, p. 151-155.

149. Tukey R.B., Mink G. Morphology and anatomy of Stem pitting in Virginia crab. In: Amer. Soc. Hort. Sci. Proc, 1961, nr. 78, p. 8-15.
150. Veller A., Bidwell D., Hultdt G. A microplate metod of enzyme-linked imunisorbent assay and its application to malaria. In: Bull. WHO, 1974, nr. 51, p. 209-211.
151. Verderevscaia T.D., Kegler H.. Stammnarburg (stem pitting) an Kern-und Stein obst. Nachr. In: Dflanzenscufz. dienst. Berlin, 1971, nr. 8, p. 153-157.
152. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Wien: Springler-Verlag, 2012, 1327 p.
153. Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Wien: Springler- Verlag, 1995, 1162 p.
154. Voller A., Bartlett A., Bidwell D.E. The detection of viruses by linked immunosorbent assay (ELISA). In: Journal Gen.Virol, 1976, vol. 33, nr. 1, p. 165-167.
155. Wallace J.M., Drake R.J. New by discovered symptoms of quisk decline and related diseases. In: Citrus Leaves, 1951, vol. 31, nr. 8-9, p. 30-35.
156. Welsh M., Keane F. Diseases of apple in British Columbia that are caused by viruses or characteristics of virus disease. In: Canadian Plant. Dis. Survey, 1961, vol. 41, nr. 3, p. 131-135.
157. Welsh M., Keane F., Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. In: Can.J.Pl. Sci, 1965, nr. 45, p. 443.
158. Welsh M.F., Uyemoto J.K. Differention of Syndromes caused in apple by graft – transmissible, xylem-affecting agents. In: Phytopathology, 1980, vol. 70, nr. 4, p. 349-352.
159. Winans C., Jones A. Isolation and characterization of tobacco ringspot virus from peach. In: Phytopathology, News, 1978, nr. 12, p. 171.
160. Wood G.A. Application of heat therapy for the elimination of viruses from ptp and stone fruit trees in New Zealand. In: N.Z.J.Agriculture Res, 1973, nr. 116, p. 255-262.
161. Yanase H., Koganezawa H., Friedlund P.R. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting and a flexuous filamentous virus associated with them. In: Acta Horticulturae, 1989, nr. 235, p. 157.
162. Yoon. J.Y. et al. Genetic Diversity of a Natural Population of Apple stem pitting virus Isolated from Apple in Korea, 2014, vol. 30, nr. 2, p.195-199.
163. Youssef S.A., et al. Detection and identification of Apple stem pitting virus Apple stem grooving virus affecting apple and pear trees in Egypt. 21 st. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. In: Julius-Kuhn-Archiv, 2010, nr. 427, p. 248-252.
164. Z-B. Wu., et al. Molecular and biological characterization of an izolate of Apple stem pitting virus causing pear vein yelows disease in Taivan. In: Journal of Plant Pathology, 2010, nr. 92 (3), p. 721-728.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Выписка из заседания учёного совета об утверждении оптимизированных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони.

EXTRAS

din procesul-verbal nr.9 al şedinţei Consiliului Ştiinţific
al Institutului Ştiinţifico - Practic de Horticultură şi Tehnologii Alimentare
din 16 decembrie 2015

prezenţi 30 din 33 membri ai
Consiliului Ştiinţific

ORDINEA DE ZI

Examinarea metodelor optimizate "Metoda de microscopie imunoelectronică pentru diagnosticarea virusului strierii lemnului mărului" şi "Metoda de analiză a reacţiei polimerazei în lanţ pentru diagnosticarea virusului strierii lemnului mărului", prezentată de către dl Leonid Prodaniuc, cercetător ştiinţific al laboratorului "Virusologie şi asanarea viţei de vie".

Ordinea de zi a fost aprobată unanim.

Decizia Consiliului:

În baza examinării avizelor referitor la metodele nominalizate s-a decis:

Se aprobă metodele "Metoda de microscopie imunoelectronică pentru diagnosticarea virusului strierii lemnului mărului" şi "Metoda de analiză a reacţiei polimerazei în lanţ pentru diagnosticarea virusului strierii lemnului mărului", optimizate de către dl Leonid Prodaniuc, cercetător ştiinţific al laboratorului "Virusologie şi asanarea viţei de vie".

În ansamblu metodele prezintă o importanţă ştiinţifică deosebită pentru domeniul biotehnologiei moleculare şi protecţiei plantelor.

Director general al IŞPHTA
Preşedintele Consiliului Ştiinţific
Doctor habilitat în agricultură



Constantin Dadu

Secretar ştiinţific
Doctor habilitat în ştiinţe tehnice

Eugenia Soldatenco

Приказ Министерства сельского хозяйства об абилитировании лаборатории вирусологии Института Плодоводства на проведение тестирования посадочного материала на наличие вирусов.

MINISTERUL AGRICULTURII ȘI INDUSTRIEI ALIMENTARE AL REPUBLICII MOLDOVA		МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА
ORDINUL ПРИКАЗ		
mun. Chișinău		
04 martie 2008		№ 44
Cu privire la producerea materialului săditor pomicol și bacifer cu calități biologice sporite		
Întru implementarea Regulamentului tehnic privind producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire, săditor pomicol și bacifer, aprobat prin ordinul Ministerului Agriculturii și Industrii Alimentare nr. 198 din 22.08.2005 (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2006, nr. 47-50, art. 168), și trecerea treptată la producerea materialului săditor pomicol și bacifer cu calități biologice sporite, categoriile biologice Prebază, Bază și Certificat și statutul fitosanitar „Liber de virusuri” (<i>virus free</i>) și „Testat la virusuri” (<i>virus tested</i>),		
ORDON:		
1. Se abilează Laboratorul de virusologie și control fitosanitar din cadrul Institutului de Pomicultură cu dreptul de efectuare a testării solului la prezența nematozilor-vectori ai virusurilor și testarea probelor vegetale la prezența principalilor viruși, conform prescripțiilor Regulamentului tehnic privind producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire, săditor pomicol și bacifer. 2. Inspectoratul de Stat pentru Semințe al Republicii Moldova (dl I. Paraschiv) și Inspectoratul de Stat Republican pentru Protecția Plantelor (dl S. Mocanu) vor asigura exercitarea controlului fitosanitar în pepinierele pomicole, conform prevederilor Regulamentului indicat în pct. 1 al prezentului ordin, în particular, în cele care dispun de baza tehnico-materială necesară pentru producerea materialului săditor de categorii biologice superioare, devirozat. 3. Direcția Generală Tehnologii Agroindustriale (dl P. Pârvan) va monitoriza respectarea condițiilor Regulamentului indicat în pct. 1 al prezentului ordin, de către toți producătorii de material săditor pomicol și bacifer. 4. Institutul de Pomicultură (dl M. Rapcea) va întreprinde măsurile de rigoare în vederea acreditării, în modul stabilit, a Laboratorului de virusologie și control fitosanitar, până la finele anului 2009, la Organul de Acreditare al Republicii Moldova. 5. Prezentul ordin va fi publicat în Monitorul Oficial al Republicii Moldova. 6. Controlul asupra executării prezentului ordin îl exercită dl Anatolie SPIVACENCO, viceministru.		
Ministru		Anatolie GORODENCO

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

от 21.05.2012

Утверждаю:

Директор «НПИСВиПТ».

Даду Константин



АКТ

Внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони».

Настоящий акт, составлен на предмет внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони» в течение 2008-2014, научным сотрудником Публичного Учреждения Научно Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий Проданюком Леонидом в Лаборатории Вирусологии с целью проведения тестирования подвоев яблони, груши и айвы, и дальнейшего производства безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Применение результатов работы Проданюка Леонида позволило провести тестирование подвоев яблони ММ-106, ЕМ-26, М-9, 62-396, подвоя айвы и груши ВА-29, исходных клонов и сортов яблони, груши и айвы на наличие вируса ямчатости древесины яблони, посаженных в Пребазисных и Базисных маточниках института. Безвирусный посадочный материал, полученный в результате проведения тестирования, реализуется по более высоким рыночным ценам.

Директор «НПИСВиПТ».

Даду Константин

Исполнитель Научный сотрудник

Проданюк Леонид

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE

Laboratorul de virusologie a plantelor pomicele

Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujeni, 14, tel.: (3732) 787714;
tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și

Industriei Alimentare al Republicii Moldova.

Ordinul № 4 din 4.03.2008.



ACTUL

de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor

din 21.05.2012

La testare au fost prezentate 212 probe de material vegetal sub formă de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și bacifer, aprobat prin ordinul nr.198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.

Informație despre proveniența probelor prelevate

Portaltoiul de măr M9	Categoria „Prebaza”, „Baza”.
Portaltoiul de măr MM106	Categoria „Prebaza”, „Baza”.
Portaltoiul de măr M26	Categoria „Prebaza”, „Baza”.
Portaltoiul de măr 762-396	Categoria „Prebaza”, „Baza”.
Portaltori de păr și gutui BA-29	Categoria „Prebaza”, „Baza”.
Soiurile de măr, păr și gutui	Categoria „Prebaza”, „Baza”.

Denumirea sectorului - plantația-mamă de portaltoiuri și altoiuri de specii pomicele.

Localitatea – or. Chișinău

Metoda testării – microscopia imuno-electronică, analiza imunoenzimatică, analiza reacției polimerazei în lanț. Data testării - 24.04-19.05.2012.

În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sînt libere de virusii ASPV, CLSV, ASGV și AMV

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr 1

Executori

cercetător științific coor. Calashean Iu.A.
cercetător științific Prodaniuc L.N.
cercetător științific Luchian V.I.

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

Акт № 1 внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

№ 1 от 24.07.2013

Утверждаю:

Директор «GT Melnic Ioana Feodor».

(с.Средние Жоры, Оргеевского района).

Мельник Виктор Васильевич.

АКТ

Внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони».

Настоящий акт, составлен на предмет внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони» в течение 2008-2014, научным сотрудником Публичного Учреждения Научно Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий Проданюком Леонидом в Крестьянском хозяйстве «GT Melnic Ioana Feodor» с целью проведения тестирования подвоев яблони, груши и айвы, и дальнейшего производства безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Применение результатов работы Проданюка Леонида позволило провести тестирование подвоев яблони ММ-106, ЕМ-26, М-9, 62-396, на наличие вируса ямчатости древесины яблони на площади 2,5 га. Безвирусный посадочный материал, полученный в результате проведения тестирования, реализуется по более высоким рыночным ценам.

Директор «GT Melnic Ioana Feodor».

Мельник Виктор

Исполнитель Научный сотрудник

Проданюк Леонид

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE

Laboratorul de protecție și virusologie a plantelor pomicele

Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujeni, 14, tel.: (3732) 787714;
tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și

Industriei Alimentare al Republicii Moldova.

Ordinul № 4 din 4.03.2008.



ACTUL

de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor

nr 7 din 24.07.2013

Este eliberat agentului economic GT "Melnik Ioana Feodor", s. Jora de Mijloc r.Orhei

La testare au fost prezentate 133 probe de material vegetal sub formă de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și bacifer, aprobat prin ordinul nr.198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.

Informație despre proveniența probelor prelevate

Portaltoiul de măr M9 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 6000buc.

Portaltoiul de măr MM106 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 4000 buc.

Portaltoiul de măr M26 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 2000 buc.

Portaltoiul de măr 62-396 Categoria „Baza”

Suprafața - ha. Cantitatea -1250 buc.

Denumirea sectorului - plantația-mamă de portaltoiuri de măr

Localitatea – s. Jora de Mijloc

Raionul – Orhei

Probele prelevate au fost prezentate la testare conform procesului-verbal nr. 2 din 25.06.2013. Cantitatea probelor prezentate – 133 buc.

Metoda testării – microscopia imuno-electronică Data testării - 4-7.07.2013

În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sînt libere de virușii ASPV,CLSV,ASGVși AMV

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr 1

Executori

cercetător științific coordonator Calashean Iu.A.
cercetător științific Prodaniuc L.N.

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE

Laboratorul de protecție și virusologie a plantelor pomicele

Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujeni, 14, tel.: (3732) 787714;
tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și
Industriei Alimentare al Republicii Moldova.
Ordinul № 4 din 4.03.2008.



**ACTUL
de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor**
nr 4 din 24.07.2013

Este eliberat agentului economic GT „Melnik Ioana Feodor”, s. Jora de Mijloc
r. Orhei

La testare au fost prezentate 20 probe de material vegetal sub formă
de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind
producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și
bacifer, aprobat prin ordinul nr.198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.

Informație despre proveniența probelor prelevate

Plantația este fondată cu material devirozat de categoria „Baza” parcela III

Soiurile de măr:

Primula 5 pomi

Vistabella 5 pomi

Romus 2 5 pomi

Akane 5 pomi

Localitatea – s. Jora de Mijloc

Raionul – Orhei

Probele prelevate au fost prezentate la testare conform procesului-verbal nr. 5 din
25.06.2013. Cantitatea probelor prezentate – 20 buc.

Metoda testării – microscopia imuno-electronică Data testării - 02.07.2013

**În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sunt infectate de virusii
ASPV, CLSV, ASGV.**

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr 1

Executori  cercetător științific coordonator Calashean Iu.A.
cercetător științific Prodaniuc L.N.

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

Акт № 2 внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

№ 2 от 25.07.2013

Утверждаю:

Директор «GT Cebotari Feodor Mihail».

(с.Средние Жоры, Оргеевского района).

Чеботарь Фёдор Михайлович



АКТ

Внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони».

Настоящий акт, составлен на предмет внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони» в течение 2008-2014, научным сотрудником Публичного Учреждения Научно Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий Проданюком Леонидом в Крестьянском хозяйстве «GT Cebotari Feodor Mihail» с целью проведения тестирования подвоев яблони и дальнейшего производства безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Применение результатов работы Проданюка Леонида позволило провести тестирование подвоев яблони ММ-106, ЕМ-26, М-9, 62-396, на наличие вируса ямчатости древесины яблони на площади 1,5 га. Безвирусный посадочный материал, полученный в результате проведения тестирования, реализуется по более высоким рыночным ценам.

Директор «GT Cebotari Feodor Mihail»

Чеботарь Фёдор

Исполнитель Научный сотрудник

Проданюк Леонид



Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

**INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII
ALIMENTARE**

Laboratorul de protecție și virusologie a plantelor pomicole
Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujeni, 14, tel.: (3732) 787714;
tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și
Industriei Alimentare al Republicii Moldova.
Ordinul № 4 din 4.03.2008.



ACTUL
de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor
nr 8 din 25.07.2013

Este eliberat agentului economic GȚ "Cebotari F.M." s. Jora de Mijloc
r.Orhei

La testare au fost prezentate 153 probe de material vegetal sub formă
de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind
producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și
bacifer, aprobat prin ordinul nr.198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.

Informație despre proveniența probelor prelevate

Portaltoiul de măr M9 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 6000buc.

Portaltoiul de măr MM106 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 6000 buc.

Portaltoiul de măr M26 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 2000 buc.

Portaltoiul de măr 62-396 Categoria „Baza”

Suprafața - ha. Cantitatea -1250 buc.

Denumirea sectorului - plantația-mamă de portaltoiuri de măr

Localitatea – s. Jora de Mijloc

Raionul – Orhei

Probele prelevate au fost prezentate la testare conform procesului-verbal nr. 3 din
25.06.2013. Cantitatea probelor prezentate – 153 buc.

Metoda testării – microscopia imuno-electronică Data testării - 7-9.07.2013

**În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sînt libere de virușii
ASPV,CLSV,ASGVși AMV**

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr _____1_____

Executori

cercetător științific coordonator Calashean Iu.A.

cercetător științific Prodaniuc L.N.

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони.

Акт № 3 внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

№ 3 от 24.07.2013

Утверждаю:



Директор «GT Ghilinschii Dumitru Feodor».

(с. Средние Жоры, Оргеевского района).

Гилинский Дмитрий Фёдорович.

АКТ

Внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони».

Настоящий акт, составлен на предмет внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони» в течение 2008-2014, научным сотрудником Публичного Учреждения Научно Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий Проданюком Леонидом в Крестьянском хозяйстве «GT Ghilinschii Dumitru Feodor» с целью проведения тестирования подвоев яблони, груши и айвы, и дальнейшего производства безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Применение результатов работы Проданюка Леонида позволило провести тестирование подвоев яблони ЕМ-26, 62-396, на наличие вируса ямчатости древесины яблони на площади 0,75 га. Безвирусный посадочный материал, полученный в результате проведения тестирования, реализуется по более высоким рыночным ценам.

Директор «GT Ghilinschii Dumitru Feodor»



Гилинский Дмитрий

Исполнитель Научный сотрудник

Проданюк Леонид

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони.

**INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII
ALIMENTARE**

Laboratorul de protecție și virusologie a plantelor pomicele

Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujerți, 14, tel.: (3732) 787714;
tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și
Industriei Alimentare al Republicii Moldova.
Ordinul № 4 din 4.03.2008.



ACTUL
de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor
nr 9 din 24.07.2013

Este eliberat agentului economic GȚ "Ghilinschii D.F.", s. Jora de Mijloc, r. Orhei
La testare au fost prezentate 45 probe de material vegetal sub formă
de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind producerea,
testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și bacifer, aprobat
prin ordinul nr.198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.
Informație despre proveniența probelor prelevate

Portaltoiul de măr M26 Categoria „Certificat”

Suprafața - ha. Cantitatea - 2000 buc.

Portaltoiul de măr 62-396 Categoria „Baza”

Suprafața - ha. Cantitatea - 2500 buc.

Denumirea sectorului - plantația-mamă de portaltoiuri de măr

Localitatea – s. Jora de Mijloc

Raionul – Orhei

Probele prelevate au fost prezentate la testare conform procesului-verbal nr. 4 din
25.06.2013. Cantitatea probelor prezentate – 45 buc.

Metoda testării – microscopia imuno-electronică Data testării - 10-11.07.2013

**În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sînt libere de virusii
ASPV, CLSV, ASGV și AMV**

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr 1

Executor

cercetător științific Prodaniuc L.N.

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

Акт № 4 внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

№ 4 от 24.07.2013

Утверждаю:

Директор SRL «Surinmih».

(с. Лалова, Резинский район).

Завтур Михаил Онуфриевич.

АКТ

Внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони».

Настоящий акт, составлен на предмет внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони» в течение 2008-2014, научным сотрудником Публичного Учреждения Научно Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий Проданюком Леонидом в SRL «Surinmih» с целью проведения тестирования подвоев яблони, груши и айвы, и дальнейшего производства безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Применение результатов работы Проданюка Леонида позволило провести тестирование подвоев яблони ММ - 106, подвоя груши и айвы ВА-29 на наличие вируса ямчатости древесины яблони на площади 1,25 га. Безвирусный посадочный материал, полученный в результате проведения тестирования, реализуется по более высоким рыночным ценам.

Директор SRL «Surinmih»

Завтур Михаил

Исполнитель Научный сотрудник

Проданюк Леонид

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

**INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII
ALIMENTARE**

Laboratorul de protecție și virusologie a plantelor pomicele

Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujeni, 14, tel.: (3732) 787714;
tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și
Industriei Alimentare al Republicii Moldova.
Ordinul № 4 din 4.03.2008.



ACTUL
de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor
nr 10 din 24.07.2013

Este eliberat agentului economic SRL "Surinmih", s. Lalova, r. Rezina
La testare au fost prezentate 53 probe de material vegetal sub formă
de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind
producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și
bacifer, aprobat prin ordinul nr. 198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.
Informație despre proveniența probelor prelevate
Portaltolul de măr MM106 Categoria „Certificat”
Suprafața - ha. Cantitatea - 4350 buc.
Portaltolul pentru gutui Categoria „Certificat”
Suprafața - ha. Cantitatea - 857 buc.

Denumirea sectorului - plantația-mamă de portaltoluri de măr
Localitatea - s. Lalova
Raionul - Rezina

Probele prelevate au fost prezentate la testare conform procesului-verbal nr. 7 din
25.06.2013. Cantitatea probelor prezentate - 53 buc.
Metoda testării - microscopia imuno-electronică. Data testării - 11-12.07.2013

**În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sînt libere de viruși
ASPV, CLSV, ASGV și AMV**

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr. 1

Executori

cercetător științific coordonator Calashean Iu.A.
cercetător științific Prodaniuc L.N.

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

Акт № 5 внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони»

№ 5 от 21.10.2013

Утверждаю:



Директор SRL «GelnacrAgro»

(с. Войнеску, Хынчешского района).

Лупанчук Георгий Васильевич

АКТ

Внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони».

Настоящий акт, составлен на предмет внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони» в течение 2008-2014, научным сотрудником Публичного Учреждения Научно Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий Проданюком Леонидом в SRL «GelnacrAgro» с целью проведения тестирования подвоев яблони, и дальнейшего производства безвирусного посадочного материала семечковых культур.

Применение результатов работы Проданюка Леонида позволило провести тестирование подвоев яблони ЕМ-26, ММ-106, М-9 на наличие вируса ямчатости древесины яблони на площади 4,15 га. Безвирусный посадочный материал, полученный в результате проведения тестирования, реализуется по более высоким рыночным ценам.

Директор SRL «GelnacrAgro»



Лупанчук Георгий.

Исполнитель Научный сотрудник

Проданюк Леонид

Акт внедрения результатов работы: «Оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони.

INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE

Laboratorul de protecție și virusologie a plantelor pomicele

Republica Moldova, 2019 mun. Chișinău, str. Costiujeni, 14, tel.: (3732) 787714; tel./fax: (37322) 764427

Abilitat de Ministerul Agriculturii și

Industriei Alimentare al Republicii Moldova.

Ordinul № 4 din 4.03.2008.



ACTUL

de testare a materialului vegetal la prezența virusurilor

nr 14 din 21.10.2013

Este eliberat agentului economic SRL "Gelnacr-Agro" s.Voinescu. R-nul Hîncești. La testare au fost prezentate 220 probe de material vegetal sub formă de lăstari în stare de vegetație în conformitate cu Regulamentul tehnic privind producerea, testarea, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire săditor pomicol și bacifer, aprobat prin ordinul nr.198 din 22.08.2005 al M.A.I.A. R.M.

Informație despre proveniența probelor prelevate

Portaltoiul de măr M26	Categoria „Certificat”	Suprafața - ha.	Cantitatea - 6000 buc.
Portaltoiul de măr MM106	Categoria „Baza”	Suprafața - ha.	Cantitatea - 10000 buc.
Portaltoiul de măr MIX	Categoria „Certificat”	Suprafața - ha.	Cantitatea - 6000 buc.

Denumirea sectorului - plantația-mamă de portaltoiuri de măr

Localitatea – s.Voinescu. Raionul – Hîncești

Probele prelevate au fost prezentate la testare conform procesului-verbal nr. 11 din 23.09.2013. Cantitatea probelor prezentate – 220 buc.

Metoda testării – microscopia imuno-electronică. Data testării - 26-29.09.2013

În rezultatul testării s-a stabilit că mostrele testate sînt libere de virușii

ASPV, CLSV, ASGV și AMV

Rezultatele au fost înregistrate în Registrul nr. 1

Executori

cercetător științific Prodaniuc L.N.

Вычисление статистических характеристик выборки при изучении качественных признаков.

Вычисления сводных характеристик выборки доли пораженных (р) и здоровых (q) растений.

Расчитываем по формуле:

$$p = \frac{n_1}{N}$$

n_1 – пораженные растения. N – здоровые растения.

$$q = 1 - p = 1 - 0,48 = 0,52 \text{ (или 52\%)}$$

Ошибку выборочной доли рассчитываем по формуле:

$$Sp = \sqrt{\frac{pq}{N}}$$

$$Sp = \sqrt{\frac{pq}{N}} = \sqrt{\frac{0,48 \times 0,52}{50}} = \sqrt{0,0049} = 0,070$$

Далее рассчитываем доверительный 95% - ный интервал генеральной доли пораженных растений в совокупности по формуле:

$$p \pm t Sp$$

t- теоретическое значение критерия Стьюдента. (В нашем случае равное 2,01).

$$p \pm t Sp: p \pm t Sp = 0,48 \pm 2,01 \times 0,070 = 0,142 \text{ (0,338} \div \text{0,622 или 33,8\%} \div \text{62,2\%)}$$

Таким образом, генеральная доля растений, поражённых вирусом ямчатости древесины яблони для сортов яблони в изучаемой совокупности с 95% - ным уровнем вероятности, составляет 33,8 – 62,2%, ошибка репрезентативности $Sp = 7\%$.

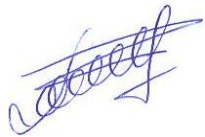
По аналогичной схеме проводили вычисления по остальным значениям зараженности латентными вирусами сортов и подвоев яблони, приведённых в таблице 3.3.

ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Нижеподписавшиеся, заявляю под личную ответственность, что материалы, представленные в докторской диссертации, являются результатом личных научных исследований и разработок. Осознаю, что в противном случае, буду нести ответственность в соответствии с действующим законодательством.

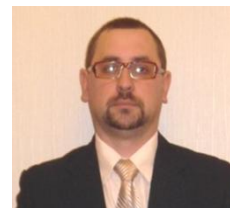
Проданюк Леонид

Подпись



Дата 26. 08. 2016.

CURRICULUM VITAE



Общая информация:

Фамилия: Проданюк

Имя: Леонид

Дата и год рождения: 17.01.1976

Образование:

1. Тираспольский Государственный Университет (1993-1998) специальность – биология – химия.
2. Государственный Аграрный Университет Молдовы (2000-2003) – докторантура.

Стажировки:

1. Шустовский винно-коньячный комбинат. г. Одесса. Украина. Лаб. вирусологии «Освоение методов диагностики вирусов винограда» организ. SPM Group (2004).
2. Киевский Институт Садоводства. Киев. Украина. Лаб. вирусологии «Освоение молекулярно-генетических методов тестирования вирусов яблони» (2007).
3. Кафедра вирусологии Киевского Национального Университета им.Т.Шевченко «Освоение молекулярно-генетического метода ОТ-ПЦР» (2011).
4. Питомниководческие хозяйства Голландии. «Производство безвирусного посадочного материала и система сертификации плодовых и ягодных культур в Голландии». ACED (2014).

Профессиональная карьера.

1. Старший лаборант Институт Биологических Методов Защиты Растений (НИИБМЗР). Лаборатория фитопатологии. (1998 - 1999).
2. Рабочий по теплице Научно-Исследовательский Селекционно-Технологический Институт Плодоводств (НИСТИП). Лаборатория вирусологии. (1999-2000).
3. Младший научный сотрудник Научно-Исследовательский Селекционно-Технологический Институт Плодоводства. Лаборатория вирусологии. (2000-2003).
4. Научный сотрудник. Научно-Исследовательский Селекционно-Технологический Институт Плодоводства Лаборатория вирусологии. (2003-н.в).
5. Консультант SPM GROUP (2002-2005).
6. Консультант SRL «Delectar» (2010-2012).

Участие в проектах национальных и билатеральных.

1. Институциональный проект «Tehnologii moderne, soiuri pomicole și bacifere orientate spre producție durabilă și securitatea alimentară» шифр: 15.817.05.02.A. (2012-2018).
2. Билатеральный проект с Кафедрой вирусологии Киевского Национального Университета им.Т.Шевченко. Украина. «Молекулярно-биологический анализ вируса ямчатости древесины яблони в коммерческих насаждениях Молдовы и Украины и поиск устойчивых сортов» Шифр: 10.820.04.04/UA. (2010-2011).
3. Билатеральный проект с лабораторией биотехнологии Института Садоводства Минск. Республика Беларусь «Мобилизация современных биотехнологических приемов в борьбе с особо опасным вирусом шарки сливы (Plum pox virus)». Шифр: 13.820.14.06/BA.(2013-2014).
4. Билатеральный проект с лабораторией биотехнологии Института Садоводства Минск. Республика Беларусь. «Оздоровление селекционно-ценных генотипов рода *Prunus domestica* от известных и ранее не описанных в Молдове изолятов вируса шарки сливы (Plum pox virus) в культуре *in vitro* и *ex vitro*». Шифр: 13.820.14.06/BA.(2015-2016).

Участие в научных конференциях национальных и международных.

- 1.Международная конференция «Биоресурсы и вирусы» г.Киев, Украина, Доклад, 2004.
2. Круглый стол по проблеме «Агротероризм». Организ. НАТО, г.Киев, Украина, 2005.
- 3.Международная конференция «Биоресурсы и вирусы». г.Киев, Украина, Доклад, 2007.
- 4.Международная конференция «Биоресурсы и вирусы» г.Киев, Украина, Доклад, 2010.
- 5.Международная конференция «Aplicovany rosline biotehnologie». Lednice, Чехия, 2012.
- 6.Междун. конференция «75-летие Олега Метлицкого». Москва, Россия, Доклад, 2013.
- 7.Семинар по производству интенсивных садов. ACED, Немиров, Украина, 2013.
- 8.Междун. конф. «Genetica, Fiziologie și Ameliorarea Plantelor». Кишинёв, Молдова, 2014.
9. Национальный форум производителей черешни. ACED, Кишинёв, Молдова, 2014.
10. Семинар по производству интенсивных садов черешни. ACED, Кишинёв, 2015.
- 11.Семинар по проблеме вируса шарки в Причерноморском бассейне. Кафедра вирусологии КНУ им Т. Шевченко, г. Киев, Украина, 2015, Доклад.

Владение языками: Русский, Румынский, Украинский, Английский.

Контакты. Тел: (+373)79674659

Адрес: Республика Молдова, Кишинёв, ул. Четатя Килия 43, кв. 47.