

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 6, Number 42 (2017), 109 – 115

D. A. Gritsenko*, G. K. Nizamdinova, O. Kh. Khamdiyeva, A. S. Dynasilov

Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: d.kopytina@gmail.com, lepestochic@mail.ru, azadahamdieva@gmail.com

**IDENTIFICATION OF FIRE BLIGHT
BY USING MOLECULAR METHODS**

Abstract: *Erwinia amylovora* is a pathogen that belongs to quarantine subjects in the Republic of Kazakhstan and causes large losses of harvest. This disease was registered in Kazakhstan in 2011. The numbers of infected plants of gardens were increased in 36 times during 5 years. It is necessary to detect the pathogen in time and prevent its further spread. In connection with this, our goal was to test the identification of a bacterial burn by using molecular genetics methods. We used real-time PCR and the sequencing of the gene encoding 16S rRNA for detection of pathogen. Out of 30 samples collected in three gardens of Almaty region, 23 samples were infected with a pathogen. Out of 15 samples without visible symptoms, 8 samples contained the pathogen. To improve the quality of detection, we used the crude extract method for DNA isolation from the samples. By using this method we were able to detect pathogen in 5 samples without visible symptoms. In addition, DNA of pathogen isolated from asymptomatic samples were sequenced with primers specific for gene encoding 16s rRNA. The variability among the 5 samples was not noted. Development of appropriate methods of DNA isolation from a small number of bacteria will serve as a guarantee of reliable detection results.

Key words: *Erwinia amylovora*, bacterial fire blight, real-time PCR, sequencing, detection, 16S rRNA, DNA.

УДК577.29

Д. А. Гриценко, Г. К. Низамдинова, О. Х. Хамдиева, А. С. Динасиллов

Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, Алматы, Казахстан

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

Аннотация. *Erwinia amylovora* – патоген, который относится к карантинным объектам в Республике Казахстан и вызывает большие потери урожая. Данная болезнь зарегистрирована в Казахстане в 2011 году, за пять лет, площади фруктовых садов, зараженных данной болезнью, выросли в 36 раз. Необходимо своевременно детектировать патоген и предотвращать его дальнейшее распространение. В связи с этим целью нашей работы являлась отработка идентификации бактериального ожога молекулярно-генетическими методами. В качестве методов исследования были выбраны ПЦР в реальном времени и секвенирование гена, кодирующего 16SpРНК. Из 30 образцов собранных в трех садах Алматинской области, 23 образца были зараженными патогеном. Из 15 образцов без видимых симптомов, 8 являлись носителями патогена. Для повышения качества детекции нами был использован метод получения грубого экстракта при выделении ДНК из образцов, что послужило выявлению 5 образцов содержащих патоген. Помимо детекции с помощью ПЦР бессимптомных образцов, ДНК образцов положительных на патоген были просеквенированы с помощью праймеров специфичных к 16spРНК. По результатам секвенирования вариабельности среди 5 образцов отмечено не было. Разработка качественных методов выделения ДНК из малого количества бактерий послужит залогом достоверных результатов детекции.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, бактериальный ожог плодовых, ПЦР в реальном времени, секвенирование, диагностика, 16S pРНК, ДНК.

Введение. *Erwinia amylovora* – грамотрицательная бактерия, вызывающая бактериальный ожог плодовых культур. Ожог является опасным заболеванием поражающим с каждым годом все больше новых площадей с фруктовыми деревьями [1]. Бактериальный ожог поражает яблоню, грушу, айву (фруктовые деревья с семечковым плодом) но способен поражать и род *Rubus* и вид *Prunussalicina* [2]. Бактериальным ожогом поражаются все органы яблони: цветки (завязь), распускающиеся почки, плоды, листья, побеги, ветви различных порядков, кора штамба [3].

При заражении плодов во второй половине лета на них появляются красновато-коричневые пятна с выделениями молочно-белого экссудата. В части растений бактерии проникают, главным образом, через ранки, трещины или натуральные отверстия, например, устьица. На развитие бактериального ожога влияют: концентрация инокулюма, относительная влажность воздуха, температура. Латентный период заметно увеличивается при снижении температуры с 29 до 16°C [4-6]. Патогенность *E. amylovora* управляется изменением физиологии хозяина [7, 8].

В сильно зараженных садах это инфекционное заболевание способно поразить до 50% насаждений, из которых 20% полностью вскоре погибают. В мировой практике рекомендуют выкорчевку и сжигание растений в садах, где усыхание деревьев достигает 30% и более [9-12]. Своевременное определение наличия бактерии в растениях приведет к предотвращению распространения заболевания внутри питомников, садов и так далее.

Обследования плодовых насаждений основной промышленной зоны садоводства Республики Казахстан (юг и юго-восток республики), показали, что бактериальный ожог получил довольно широкое распространение. В Южно-Казахстанской области из 17 обследованных хозяйств в 9 обнаружено поражение яблони и груши бактериальным ожогом, причем в некоторых садах – сильное. Так, например, в хозяйстве «Джалибаба» на сорте яблони Конфетка распространенность болезни (P) составила 100 % со степенью развития (R) 67 %, на сорте Голден Делишес – 80 и 49 % соответственно. В хозяйстве «Хатин» распространение болезни на сорте груши Талгарская красавица составило 65 %, развитие – 16,4 %. Сильно была поражена айва, произрастающая в защитных полосах садов. В Жамбылской области обследовано 20 хозяйств. Сильное поражение яблони сортов Бабушкино и Апорт обнаружено в ОПХ «Меркенский», где распространение болезни составило 95 и 100 %, развитие – 36,4 и 46,2 % соответственно. Чаще поражались американские сорта: Голден Делишес – распространение болезни до 70 и развитие – 20,4 %, Айдаред – 50 и 12,3 %, но самым восприимчивым сортом оказался РедДелишес – 100 и 32,5 %. Отмечено, что во многих обследованных хозяйствах наиболее восприимчива к бактериальному ожогу груша (на сорте Талгарская красавица распространение болезни составило 100 % при степени развития 43,3 %). В Алматинской области обследования проведены в 19 хозяйствах, из них в 13 обнаружены очаги болезни, а в отдельных хозяйствах ожог плодовых получил широкое распространение [13].

Наиболее подвержен поражению бактериальным ожогом сорт Апорт, на котором индексы болезни составляют: P – 70–85 %, R – 32,4–36,3 %, затем следуют Румянка Алматинская (P – 65 %, R – 17,5 %) и Рашида (P – 75 %, R – 31,2 %). В этой области также сильно поражаются американские сорта, особенно Голден Делишес. В Западно-Казахстанской области пораженность яблони ожогом плодовых варьировала от 2 до 15,9 % с развитием от 0,8 до 7,6 % на сорте Спартак. В Атырауской области на сорте яблони Голден Делишес индексы болезни составили: P – 5,7–9,6 % и R – 1,9–4,5 %. В Кызылординской области распространение болезни на сорте яблони Голден Делишес составило 6,7–10,8 %, развитие – 3,4–5,3 %. В Актыубинской области бактериальный ожог не обнаружен. Обследование садов показало, что бактериальный ожог стал одним из вредоносных заболеваний плодовых в Казахстане, особенно на груше и яблоне [14].

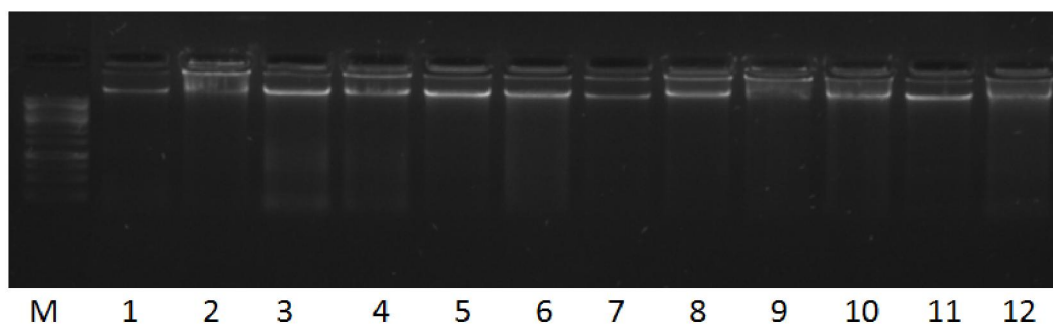
Вредоносность болезни выражается как в потере урожая, так и в затратах на выкорчевку больных деревьев и восстановлении плодовых насаждений, кроме того, болезнь отрицательно влияет на рост и развитие деревьев. По данным исследований за 2013–2014 гг., бактериальный ожог существенно влияет на ростовые процессы и урожай яблони. Так, прирост однолетних побегов уменьшается в 2,2 раза, площадь листовой поверхности – в 1,5 раза, урожай с дерева – в 2,5 раза. Кроме того, болезнь отрицательно влияет на водный режим яблони: содержание общей воды в листьях уменьшается на 7,1–11,9 %, концентрация клеточного сока повышается на 3,5–5,9 %. У пораженных деревьев повышается интенсивность транспирации листьев, ухудшается биохими-

ческий состав плодов: общий сахар уменьшается на 2,44 %, витамин С – на 5,15 %, сухое вещество – на 1,7 %, кислотность увеличивается на 1,7 % [13, 14].

В настоящий момент имеются несколько методик, с помощью которых осуществляется диагностика *Erwinia amylovora* [15, 16]. Одни методы основаны на использовании антител и называются серологическими, другие же методы разработаны для диагностики ДНК патогена [17]. Вторые методы включают ПЦР анализ и различные его модификации [18]. Кроме того используются ДНК-чипы и баркодирование, но данные методы дорогостоящие и трудоемкие в виду чего в лабораториях с большим потоком образцов для детекции используются редко [19]. Наибольшее использование для точного и быстрого определения патогена в образцах используют ПЦР в реальном времени [20]. В настоящей работе мы исследовали 30 образцов из Алматинской области для обнаружения патогена в яблоневых садах с помощью ПЦР в реальном времени на основе методики Taqman. Нами был модифицирован метод выделения ДНК для повышения качества детекции *Erwinia amylovora* в исследуемых образцах, так как выделение ДНК производится со смывов соответственно качественное изоляция ДНК приводит к достоверной детекции. Начальная стадия развития заболевания или латентная форма ограничены малым количеством патогена соответственно и ДНК патогена, что затрудняет достоверно определить наличие бактерии, разработка нового метода позволила повысить качество выделения ДНК из патогена.

Материалы и методы. Сбор образцов. Из 3 яблоневых садов было собрано 30 образцов (ветки с листьями). Для обнаружения патогена было выбрано 15 деревьев без симптомов бактериального ожога и 15 деревьев с явно выраженными признаками поражения. В случае последних, отбирались ветки и листья с симптомами. Далее с листьев и веток был произведен смыв с помощью фосфатного 0,1 % буфера с Tween 20.

Выделение ДНК из бактериальной культуры. Выделение ДНК осуществлялось с помощью набора реактивов проба-ГС (АгроДиагностика, Россия). Метод предназначен для работы с культурами бактерий, смывами с твердых питательных сред, который основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидинатиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (силика) (рисунок 1). Также в работе мы использовали дополнительный метод выделения ДНК с применением прямого использования грубого экстракта ПЦР. Данным методом выделяли ДНК из смывов бессимптомных образцов. После получения смыва объемом 80 мл нами было осуществлено осаждение в течении 10 минут при 1,5 тыс. оборотов с дальнейшим осаждением супернатанта при 7 тыс. об в течении 20 минут. Далее осадок разбавляли в 2 мл и кипятили в водяной бане при 100 °С в течении 15 минут. Данный полученный грубый экстракт был использован в ПЦР в реальном времени.



M – DNA Ladder GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific, USA)
1–12 – ДНК выделенная из образцов периферической крови

Рисунок 1 – Электрофореграмма выделенных образцов ДНК

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР был использован набор реактивов *Erwinia amylovora* (Real-time PCR) компании АгроДиагностика. Набор содержит пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации. Постановка ПЦР осуществлялась, следуя инструкции комплекта реагентов. Амплификация и детекция проходили при использовании амплификатора Line-gene 9660 (Bioer, China). В постановке использовали по 2 повтора каждого образца.

ПЦР-амплификация гена 16S рРНК. Для проведения секвенирования гена 16S рРНК был получен ПЦР-продукт с использованием специфических праймеров для гена 16S рРНК: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') [21].

ПЦР-амплификацию проводили в объеме 25 μ L содержащий 1 μ L ДНК-матрицу, 2,5 μ L 10 \times ПЦР-буфера, 2,5 μ L 25 мМMgCl, 0,5 μ L 10 мМdNTP, 10 пмоль каждого праймера, 0,3 μ L Taq ДНК полимеразы и 17,2 μ L стерильной деионизированной воды. Амплификацию проводили с помощью термоциклира SimpliAmp (Applied Biosystems (ABI), USA). Режим ПЦР был следующим: начальная денатурация при 95 $^{\circ}$ C в течение 5 мин.; 94 $^{\circ}$ C – 30 сек., 53 $^{\circ}$ C – 30 сек., 72 $^{\circ}$ C – 40 сек., всего – 35 циклов, с заключительным синтезом при 72 $^{\circ}$ C в течении 9 мин.

Секвенирование 16S рРНК. Секвенирование амплифицированных фрагментов гена 16SpРНК осуществлялось с использованием набора реактивов “BigDye Terminator Kit v.3.1 (Applied Biosystems, USA) на автоматическом одно капиллярном секвенаторе 310 (Applied Biosystems, USA) в соответствии с рекомендациями изготовителя [22-24].

До проведения секвенирования амплифицированные продукты с праймерами 27F и 1492R были очищены с помощью набора “GeneJet PCR Purification kit” (ThermoScientific, USA), согласно инструкции производителя и затем секвенированы. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивались с последовательностями базы данных GeneBank с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Результаты и их обсуждение

Результаты амплификации в реальном времени. Результаты амплификации показывают, что бессимптомные образцы являются носителями патогенна в 50% случаев (таблица 1). При использовании метода прямого использования грубого экстракта, в 5 бессимптомных образцах была выявлена *Erwinia amylovora*, в то время как при выделении ДНК из данных образцов с помощью комплекта реагентов проба-ГС результат амплификации был отрицательным (таблица 2). Для выделения ДНК из смывов и при наличии малого количества патогена, необходимо использовать более качественные методы выделения ДНК для предотвращения выдачи ложно-отрицательных результатов.

Таблица 1 – Результаты ПЦР в реальном времени на ДНК, выделенную методом получения грубого экстракта из смывов образцов без симптомов

Грубый экстракт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
FAM	0	38	40	0	0	0	41	39	0	45	0	0	37	38	36
HEX	24	25	24	26	27	25	28	26	25	27	25	24	25	26	27

Образцы с симптомами в 100% случаев были зараженными патогеном. Для выделения ДНК из смывов образцов с симптомами использовался набор проба - ГС.

Таблица 2 – Результаты ПЦР в реальном времени на ДНК, выделенную при использовании проба - ГС из смывов образцов без симптомов

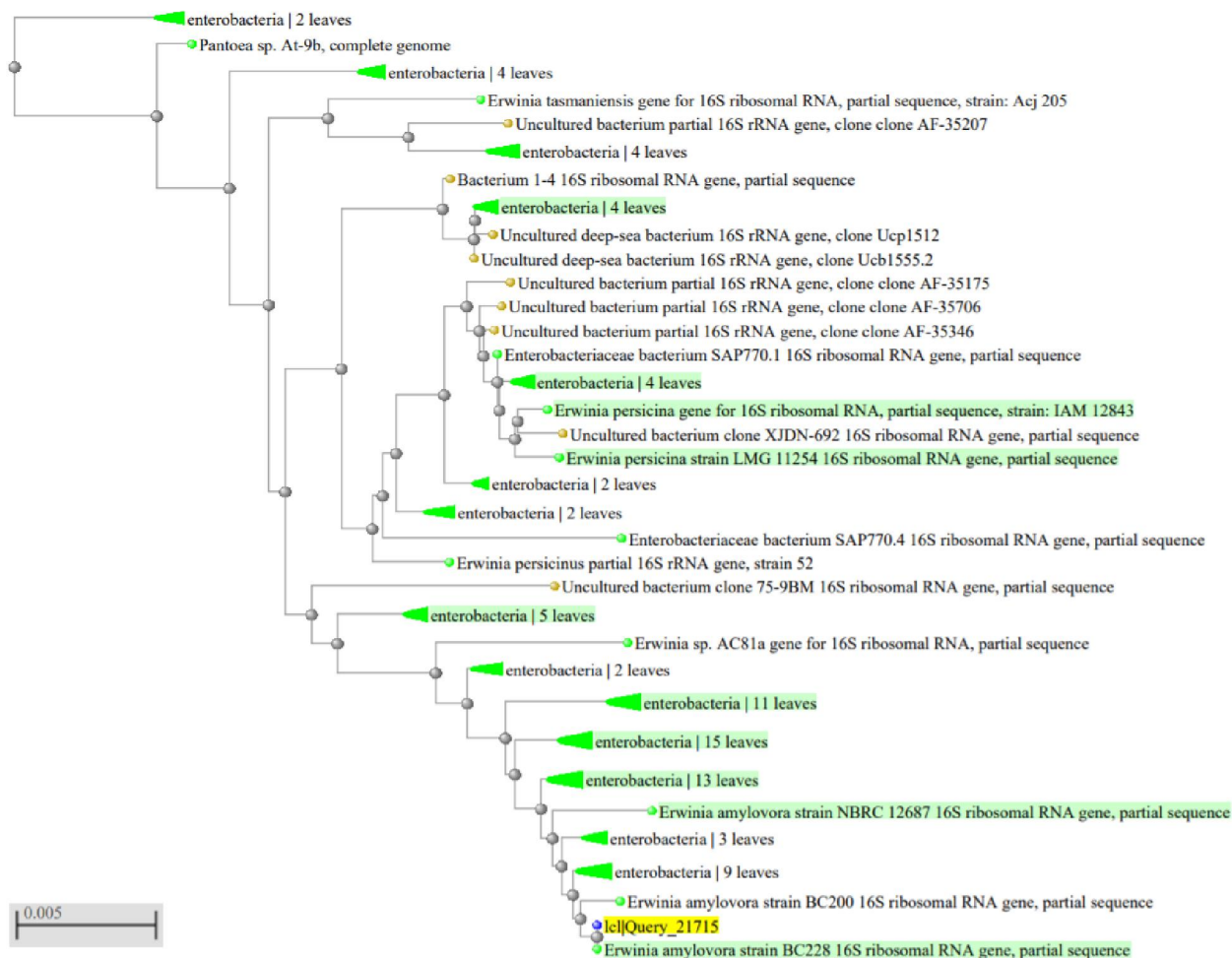
Проба ГС	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
FAM	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	0	36
HEX	24	25	24	26	27	25	28	26	25	27	25	24	25	26	27

Отсутствие явно выраженных признаков заражения, а также несвоевременное обнаружение патогена поспособствует в дальнейшем заражению всего сада. Необходим постоянный мониторинг садов не только культурных, но и диких, для предотвращения распространения инфекции.

Помимо детекции с помощью ПЦР в реальном времени, ДНК образцов положительных на патоген (2,3,7,8,10,13-15) была просеквенирована с помощью праймеров специфичных

к 16s РНК. Для секвенирования были использованы универсальные праймера 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') покрывающие практически весь ген 16s РНК (1500 п.о.) [30]. По результатам секвенирования вариабельности среди образцов отмечено не было.

Нами было построено филогенетическое древо (рисунок 2) относительно образцов базы данных NCBI, как видно из дендрограммы образцы из Алматинской области наибольшее родство имеют относительно изолятов BC200 и BC228.



Желтым цветом помечен исследуемый образец, зеленым цветом отмечены кластеры *Enterobacteria*.

Рисунок 2 – Дендограмма результатов построения филогенетического древа при использовании метода ближайшего соседа (*Neighborjoining*)

Заключение. *Erwinia amylovora* является патогеном относящемся к карантинным объектам в фитосанитарии в том числе и в Республике Казахстан и вызывает большие потери урожая. Необходимо своевременно обнаруживать патоген и предотвращать его дальнейшее распространение. Для осуществления качественного мониторинга используются такие чувствительные методы как ПЦР в реальном времени на основе детекции накопления флуоресценции. Классические методы (ИФА, классический ПЦР) обнаружения патогена на данный момент применяются реже, так как не обладают такой чувствительностью по сравнению с современными молекулярными методами. Одним из важных аспектов обнаружения патогена является качественное выделение ДНК патогена, так как в лабораториях с большим потоком образцов нет возможности и необходимости выращивать бактерии в течении 3–5 дней, ввиду чего используются смывы с образца. Но для использования смывов, необходимо иметь качественные методы выделения ДНК без потерь, которые в

последующем могут послужить основой для получения ложноотрицательного результата. Для преодоления данных проблем нами был использован метод получения грубого экстракта, что способствовала получению достоверных результатов относительно исследуемых образцов. 5 бессимптомных образцов при выделении ДНК методом получения грубого экстракта были положительными на наличие патогена (ПЦР в реальном времени), в то время как при выделении ДНК с помощью проба-ГС показали отрицательный результат. Из 30 (15-образцы с симптомами заражения; 15-образцы без симптомов заражения) образцов 75% образцов были положительны на наличие *Erwinia amylovora*, из них 8 бессимптомных образцов дали положительный результат, что говорит либо о начальной стадии заражения либо о латентной формы инфекции. Правильная диагностика патогена, в особенности при анализе на патоген посадочного материала, приведет к предотвращению распространения инфекции и снижению экономических потерь от бактериального ожога.

REFERENCES

- [1] Van der Zwet T. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases // *Acta Horticulturae*. 2002. Vol. 704, N 35. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.1
- [2] Mohan S.K., Thomson S.V. An outbreak of fire blight in plums // *Acta Horticulturae*. 1996. Vol. 411, N 73. DOI: 10.17660/ActaHortic.1996.411.17
- [3] Braun P.C., Hildebrand P.D. Epidemiology of fire blight of floricanne fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora* // *Can. J. Plant Pathol.* 2006. Vol. 28, N 1. P. 95-99.
- [4] Laux P., Zeller W. Studies on the biological control of fire blight in Egypt // *Bundesanst Zichtungsforsch Kulturpflanz*. 2002. Vol. 8, N 3. P. 46-48.
- [5] Norelli J.L., Beer S.V. Factor affecting the development of fire blight blossom insections // *Acta Horticulturae*. 1984. – Vol. 151. P. 37-39.
- [6] Bakshan O.Ya., Sadyak A.M., DiagnSmetnik, A.I. Bakterialnyy ozhog plodovyykh // *Zaschitai karantin rastenyostika bakterialnogo ozhoga plodovyykh // Zaschitai karantin rastenyiyyu*. 2003. N 10. P. 38-39.
- [7] Blachinsky D., Shitenberg D., Weinthal D., Manulis Sh., Zamski E. Effects of growth regulators and pruning on the susceptibility of pear trees to *Erwinia amylovora* // *Phytoparasitica*. 2005. Vol. 33, N 3. P. 294-295.
- [8] Klietman F., Blachinsky D., Oppenheim D., Zilberataine M., Drar O., Manulis Sh. *Erwinia amylovora* populations resistant to oxolinic acid in Israel: Prevalence, persistence and fitness // *Plant Pathol.* 2005. Vol. 54, N 2. P. 108-115.
- [9] Bakshan O.Ya., Sadyak A.M. Diagnostika bakterialnogo ozhoga plodovyykh // *Zaschitai karantin rastenyiyyu*. 2004. N 3. P. 46-47. ISSN 0044-1864
- [10] Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaymurzina A.A., Zharmuhamedova G. A., Aytkulov A.K. Bakterialnyy ozhog plodovyykh kultur v Respublike Kazahstan // *Karantin rastenyiyyu. Nauka i Praktik*. 2013. N 3. P. 39-43. ISSN 2306-9767.
- [11] Verderevskiy D.D. Bakterialnyy ozhog plodovyykh derev // *Sadovodstvo, vinogradarstvo i vinodelie Moldavii*. 1960. N 3. P. 60-61.
- [12] Iskandaryan R.A. Bakterialnyy ozhog plodovyykh v Armenii // *Zaschita rastenyiyyu*. 1991. N 4. P. 50.
- [13] Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaymurzina A.A., Zharmuhamedova G.A., Aytkulov A.K. Bakterialnyy ozhog plodovyykh kultur v Respublike Kazahstan // *Karantin rastenyiyyu. Nauka i praktika*. 2013. N 1. P. 39-43. ISSN 2306-9767.
- [14] Sagitov A.O., Isin M.M., Dzhaymurzina A.A., Kopzhasarov B.K., Dzhumanova Zh.K., Umiralieva Zh. Bakterialnyy ozhog plodovyykh kultur v Kazahstane // *Materialyi mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii Problemy i Poiski. Suzhdeniya. Zaschitai karantin rastenyiyyu*. 2015. N 9. P. 13-15.
- [15] Llop P., Donat V., Rodriguez M. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29 // *Phytopathology*. 2006. Vol. 96. P. 900-907. DOI: 10.1094/PHYTO-96-0900.
- [16] De Bellis P., Schena L., Cariddi C. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers // *European Journal of Plant Pathology*. 2007. Vol. 118. P. 11-22. DOI: 10.1007/s10658-006-9078-4
- [17] Mizuno A., Sato S., Kawai A. Serological differences among *Erwinia amylovora* biovars // *Journal of General Plant Pathology*. 2002. Vol. 68, N 4. P. 350-355.
- [18] Ryazantsev D.Yu., Abramov D.D., Zavriev S.K. Diagnostika karantinnykh fitopatogenov metodom PTsR v formate Flash // *Selskohozyaystvennaya biologiya*. 2009. N 3. P. 114-117.
- [19] Mazurin E.S., Kopina M.B., Sherokolava N.A. Kontrol dostovernosti rezultatov fitosanitarnoy ekspertizy pri ispolzovanii molekulyarnykh metodov diagnostiki // *Vestnik RUDN. Seriya Agronomiya i zhivotnovodstvo*. 2012. № 3. P. 31-38.
- [20] Gottsberger R.A. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora* // *Letters in Applied Microbiology*. 2010. Vol. 51. P. 285-292.

Д. А. Гриценко, Г. К. Низамдинова, О. Х. Хамдиева, А. С. Динасилов

Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институтының энтомология зертханасы,
Алматы, Қазақстан

БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙІКТІ МОЛЕКУЛАЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘДІСТЕРМЕН ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Аннотация. *Erwinia amylovora* Қазақстан Республикасында да фитосанитарияның карантинді объектісіне жататын патоген және ол егістік өнімділігін томендеуіне себеп болады. Бұл ауру 2011 жылы Қазақстанда тіркелді және бес жыл бойы бұл ауру жұқтырған бақтардың ауданы 36 есе өсті. Патогенді уақытылы анықтап оның таралуының алдын алу маңызды. Осыған байланысты, осы зерттеудің мақсаты молекулярлық-генетика әдістерімен *бактериалық* күйік анықтамасын жүргізу, тіпті өсімдіктің ауру белгілері жоқ болған кезде. Зерттеу әдістері ретінде нақты уақытта ПТР және 16S рРНК кодтау гены секвенированиясы таңдалды. Алматы облысының 3 бағынан жиналған 30 үлгінің 23-і патогенмен зақымдалған. Зақымдалмаған 15 үлгінің 8-і патоген тасымалдаушылар. Патогенді анықтау сапасын арттыру үшін біз шикі сығынды алу әдісін қолдандық. Үлгілерден ДНҚ молекуласын бөлу барысында патогені бар бес үлгі анықталды. ПТР анықтауна басқа 16S рРНК арналған ерекше праймерлерін пайдаланып симптомсыз үлгілердің ішінде патогені бар үлгілердің ДНҚсына секвенирование жасалды. Секвенирлеу қорытындысы бойынша 5 үлгілерін арасында вариативтігі байқалған жоқ. Аз мөлшердегі бактериялардың ДНҚ молекуласын бөлу әдістерін құрастыру патогенді анықтаудың сенімді нәтижесінің кепілі.

Түйін сөздер: *Erwinia amylovora*, жемістілердің бактериялық күйігі, нақты уақыттағы ПТР, секвенирование, диагностика, зияндылығы.