

ХҒТАР 68.37.05
Ғылыми мақала

<https://doi.org/10.32523/2616-7034-2026-156-3-100-113>

Алма ағашындағы цитоспороз ауруын диагностикалауға арналған электрохимиялық биосенсор әдісі

К. Дюсембаев¹ , А. Спанбаев² , Д. Утеулиева³ ,
Г. Салхожаева⁴ , З. Умирбаева⁵ , С. Наекова⁶ ,
Г. Мукиянова⁷ , Ж. Тулегенова^{8*} 

^{1,2,4,6,8} Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

^{1,6,8} Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан

³ М.Өтемісов атындағы Батыс Қазақстан университеті, Орал, Қазақстан

⁵ Ш.Есенов атындағы Каспий технологиялар және инжиниринг университеті, Ақтау, Қазақстан

⁷ Шәкәрім университеті, Семей, Қазақстан

(E-mail: 1dyussebayev@biocenter.kz, 2spanbayev@gmail.com, 3d.t.uteulieva@gmail.com, 4salkhozhayeva@gmail.com, 5umirbaeva.zoya@gmail.com, 6n.saltan@mail.ru, 7gmukiyanova@gmail.com, *8zhan.ta.enu@gmail.com)

Аңдатпа Алма - ең көп өсірілетін жеміс ағаштарының бірі, ал цитоспороз - бұтақтардың ісінуін және өлімін тудыратын ауру. Ауруды емдеу негізінен фунгицидтерді қолдану арқылы жүзеге асырылады. Дегенмен, химиялық заттарды шамадан тыс пайдалану жеміс сапасына, сондай-ақ қоршаған ортаға айтарлықтай әсер етеді, сонымен бірге алма аз өндіретін елдер үшін бұл экономикалық тұрғыдан тиімсіз. Мәселе ауруды дер кезінде диагностикалау арқылы аурудың таралуына қарсы негізделген басқару стратегиясын құру арқылы шешілуі мүмкін. Сондықтан қоздырғышты ерте анықтау және сандық анықтау үшін пайда болатын сенімді және арзан диагностикалық құралға қажеттілік бар. Осы мақсатқа арналған бірнеше кәдімгі зертханалық талдаулар болғанымен, оларда қарапайымдылық пен селективтілік жоқ, ең бастысы, оқытылған қызметкерлерді қажет етеді. Бұл мақала молекулярлық анықтаудың әдеттегі әдістерін алмастыра алатын электрохимиялық биосенсор әдісінің жасалғанын сипаттайды. Аталған әдіс қолданыстағы сандық ПТР тәсілдеріне қарағанда жүз есе сезімтал болып табылады.

Түйін сөздер цитоспороз, алма, ауру диагностикасы, электрохимиялық биосенсор, аффинді әрекеттесу

Кіріспе

Дүние жүзінде ең көп өсірілетін жемістердің бірі болып табылатын алманы (*Malus domestica* Borkh.) тұтыну ондағы қоректік заттар мен биоактивті қосылыстардың көптігіне байланысты ежелден бері ынталандырылған. Алмадағы пайдалы компоненттер әртүрлі елдердің, аймақтардың немесе континенттердегі түрлер немесе сорттар ішінде табуға болатын түрі мен мөлшері бойынша өзгереді; және құрамы жағынан бөліктермен (жеміс жұмсағы, қабық, жапырақ, тұқым және тамыр) ерекшеленеді [1-3]. Дегенмен, жемістер (әсіресе алма) адамдарды әртүрлі аурулардан сақтайды, бірақ олардың өздері патогендік инвазияларға бейім және сапасы мен өнімін жоғалтуға әкелетін әртүрлі аурулардан зардап шегеді. Фитопатогендер, әсіресе патогенді саңырауқұлақтар, бүкіл әлем бойынша экономикалық маңызды ауылшаруашылық дақылдарының айтарлықтай зақымдалуына және жоғалуына әкелетін әртүрлі өсімдік ауруларын тудырады [4,5]. Солардың ішінде *Cytospora* түрлері қоздыратын цитоспороз бүкіл әлем бойынша алма өндірісін шектейтін алма ағаштарының ең жойқын саңырауқұлақ ауруларының бірі болып табылады [6,7]. Бүгінгі күні шамамен 150 *Cytospora* түрлері дүние жүзіндегі 130-дан астам ағаш тектес өсімдіктердің бұтақтардағы ісік жаралары (cankers) мен өлуіне әкелетіні хабарланған [8,9].

Қоздырғыш алма ағашының сыртқы ауру белгілері байқалмайтын ұлпаларында да жасырын сақталуы мүмкін, бұл инфекцияны ерте молекулалық анықтаудың маңыздылығын арттырады [10,11].

Ауруды бақылаудың қолайлы деңгейіне жету үшін көбінесе фунгицидтер қолданылады. Дегенмен, фунгицидтерді ұзақ немесе артық қолдану саңырауқұлақ популяцияларында белгілі бір әсер ету режиміне төзімділіктің жоғарылауы немесе сезімталдықтың төмендеуіне әкеледі. Сондықтан оңтайлы химияны алдын ала тиімдірек қолдану үшін себепші қоздырғыштарды дәл, сезімтал және жылдам анықтауға көмектесетін құралдарды жасау өте маңызды [12]. Бұл, өз кезегінде, егістік жүйесіндегі химиялық қолданудың қажетсіз саны мен мөлшерін азайтады, осылайша патогендік популяциялардағы таңдамалы қысымды және қоршаған ортаға ықтимал қайталама әсерлерді азайтады [13-15]. Қазіргі бірнеше молекулярлық диагностикалық әдістер өсімдік қоздырғышын анықтауға салыстырмалы түрде сезімтал және селективті тәсілдерді ұсынса да, олар күрделі үлгіні дайындау әдістерімен, уақытты қажет ететін талдаулармен және қымбат та күрделі жабдықтар мен реагенттерді қолданумен шектеледі [12,16-18].

Соңғы әзірлемелер электрохимиялық сигналды анықтау арқылы жалаң алтын электрод бетіндегі ДНҚ адсорбциясын тікелей өлшеудің арзан, сенімді және сезімтал диагностикалық талдауларды әзірлеуге әлеуеті бар екенін көрсетеді. Электрохимиялық ДНҚ-биосенсорлар жоғары сезімталдығы, салыстырмалы түрде жылдам талдау мүмкіндігі және ықшам құрылғылармен үйлесімділігіне байланысты патогендерді анықтауға арналған перспективалы платформалар болып табылады [19-21]. Шынында да, тікелей ДНҚ-алтын адсорбциясына негізделген бірнеше электрохимиялық биосенсорлық талдаулар қатерлі ісік диагностикасында сәтті қолданылған. Шынында да, тікелей ДНҚ-алтын адсорбциясы бар бірнеше электрохимиялық биосенсорлық талдаулар қатерлі ісік диагностикасына сәтті енгізілді [22-24]. Бұл жүйелер ДНҚ мен алтын беті арасындағы аффинді әрекеттесуіне негізделген және электростатикалық әрекеттесулерді, гидрофобты күштерді және ДНҚ/алтын молекулаларының химиялық байланысын қоса алғанда, бірнеше ковалентті емес күштердің қатысуына негізделген. Бұл тәсілдің басты артықшылығы биосенсор әдісті жобалау үшін күрделілік тудыруы мүмкін кез келген қосымша будандастыру қадамдарын болдырмау мүмкіндігі болып табылады [25]. Жұмыста ДНҚ молекуласының жалаң алтын бетімен аффинді өзара әрекеттесуінің механизмі және оның биосенсорларда

қолдану мүмкіндігі қарастырылған. Өсімдік патогендерін анықтауда да электрохимиялық тәсілдердің тиімділігі көрсетілген. Мысалы, алтын нанобөлшектерін, стрептавидинмен қапталған магниттік моншақтарды және дифференциалды импульстік вольтамметрияны біріктіретін әдіс өсімдік үлгілеріндегі патоген ДНҚ-сын ауру белгілері пайда болғанға дейін анықтауға мүмкіндік берген [25].

Бұл зерттеу алмадағы цитоспороз ауруын ерте диагностикалау үшін ДНҚ-алтынға тікелей аффинді әрекеттесуіне негізделген амплификациясыз электрохимиялық биосенсор әдісінің жасалғанын сипаттайды. Электрохимиялық сигнал дифференциалды импульстік вольтметрия (ДИВ) көмегімен анықталды. Ұсынылған әдіс қажетті далалық валидациядан кейін алма бақтарындағы цитоспорозды ерте және сандық анықтауда дәстүрлі зертханалық әдістерді толықтыратын перспективалы құрал бола алады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Материалдар және зонд дизайны

Осы зерттеуде пайдаланылған барлық химиялық реагенттер Sigma Aldrich (Германия) компаниясынан сатып алынған. Тәжірибе барысында Ultra-Pure H₂O (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) суы қолданылды. Биотинилденген ұстау зондының құрғақ аликвотын (AC-27_DP) Integrated DNA Technologies (Коралвилл, АҚШ) әзірлеген. AC-27_DP зондының тізбегі *Cytospora sorbina* AC-27 изолятының трансляциялық ұзарту факторы 1-α геніне (GenBank қосылу нөмірі: PP860571) комплементарлы 30 нуклеотидтен құрастырылған. Сонымен қатар, зондтың ұшына биотин бекітілді: GTG ATA CCA CGC TCA CGC TCG GCC TTC AAT /3Bio/.

Саңырауқұлақ культуралары және геномдық ДНҚ экстракциясы

Бұл зерттеуде бұрын біздің ғылыми топ [9] анықтаған *Cytospora* түрлерінің барлығы 11 изолят пайдаланылды. Изоляттар Алматы облысының 5 алма бақтарындағы цитоспорозды ісік ауруымен зақымдалған бұтақтары ретіндегі 113 үлгіден бөлініп алынды. Қазақстандағы кейінгі зерттеулер де алма ағаштарында бірнеше патогенді *Cytospora* түрлерінің кездесетінін және алма сорттарының оларға сезімталдығы әртүрлі болатынын көрсетті [26]. Оқшауланған изоляттар стерильді тазартылған суда агар тығындары құрамында 4°C температурада сақталды. Саңырауқұлақ изоляттарынан геномдық ДНҚ классикалық фенол-хлороформ әдісі [27] арқылы бөлінді және ДНҚ тазалығы NanoDrop ND-1000 UV-Vis спектрофотометрімен (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) анықталды. ДНҚ тұтастығы RedSafe™ нуклеин қышқылын бояу ерітіндісімен (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) бояу арқылы агароза (1%) гель электрофорезі арқылы анықталды және УК трансиллюминаторында (Bio-Rad, АҚШ) визуалды түрде көрсетілді. ДНҚ мөлшері Invitrogen Qubit 4 флуорометрімен (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) өлшенді. Үлгісіз бақылау ретінде ешқандай ДНҚ үлгісі қосылмаған талдау қоспасы пайдаланылды.

ДНҚ-ның магниттік оқшаулануы және алтын электрод бетіндегі адсорбция

Бастапқыда 10 мкл таза саңырауқұлақ ДНҚ, 15 мкл 10 мкМ биотинленген ұстау зонды және 10 мкл 5X тұзды-натрий цитраты (SSC) буфері (рН 7) микроцентрифуга түтігінде араластырылды және 95°C температурада 3 минут бойы қыздырылды. Кейіннен мақсатты бір тізбекті ДНҚ мен түсіру зондының арасында будандастыруға мүмкіндік беру үшін қоспасы термомиксерде (300 айн/мин) бөлме температурасында 30 минут бойы инкубацияланды. Бұрын жуылған 5 мкл стрептавидинмен таңбаланған Dynabeads MyOne стрептавидин C1 (Invitrogen, Австралия) магниттік моншақтары мақсатты зонд кешеніне тасымалданып, биоманиттік қабықшамен жабыстырылуын жеңілдету үшін

бөлме температурасында термомиксерде (300 айн/мин) 30 минут бойы инкубацияланды. Магниттік моншақтар мен мақсатты зонд кешені содан кейін магниттік тырманың көмегімен оқшауланды және 2X байланыстыру және жуу буферімен үш рет жуылды және 10 мкл ультра таза суда қайта суспензияланды. Қоспа 95 °C температурада 3 минут бойы қыздырылды және босатылған мақсатты бір тізбекті ДНҚ бар супернатанттың 5 мкл магнит арқылы динамиктерді оқшаулаудан кейін дереу жиналды. Содан кейін босатылған бір тізбекті ДНҚ-ға 15 мкл 5X SSC буфері (pH 7.0) қосылды және әрі қарай пайдаланғанша 4 °C температурада сақталды.

Биотинделген нуклеин қышқылдарын стрептавидинмен қапталған магниттік моншақтар арқылы бөліп алу және қыздыру арқылы босату тәсілі бұрын өсімдік патогендерінің ДНҚ-сын электрохимиялық анықтауда қолданылған [19].

Электрохимиялық көрсеткіш

Электрохимиялық өлшеулер экранмен басып шығарылған алтын электродта (SPGE) үш электродты жүйесі (алтын жұмыс электродынан, сондай-ақ Ag/AgCl референтті және алтынға қарсы электродтардан тұрады) бар CN1040C потенциостатының (CN Instruments, АҚШ) көмегімен орындалды. Бұл ерітіндінің 10 мкл көлемі SPGE-нің жұмыс электродының бетіне тікелей жағылды және 30 минут бойы инкубациялады (термомиксер, 300 айн/мин, бөлме температурасында). Содан кейін электрод электрохимиялық көрсеткіш арқылы талдау алдында 10 mM фосфат буферінің тұзды ерітіндісімен (pH 7,4) жуылды. SPGE-ге құрамында 2,5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{4-}$ (1:1 қатынасында) және 0,1 M KCl бар 10 mM фосфат буферінің ерітіндісінен (pH 7) тұратын 50 мкл электролит буферінің көлемі қосылды. DPV сигналдары импульстік амплитудасы 50 мВ және импульс ені 50 мс болатын -0,2 В-тан 0,5 В-қа дейін жазылды. Дифференциалды импульстік вольтамметрия және феррицианид/ферроцианид редокс-жұбы нуклеин қышқылдарының электрод бетіне байланысуынан туындайтын электрохимиялық өзгерістерді сезімтал анықтау үшін кеңінен қолданылады [21,28].

Ағымдағы жауап өзгерісінің пайызы мына теңдеу арқылы есептелді:

$$\% \text{ ағымдағы жауап өзгерісі} = [(i_{\text{Таза}} - i_{\text{Абсорбция}}) / i_{\text{Таза}}] \times 100$$

Мұндағы $i_{\text{Таза}}$ және $i_{\text{Абсорбция}}$ сәйкесінше жалаң электрод және ДНҚ функционалданған электрод үшін ток тығыздығы болып табылады.

Әдіс селективтілігі мен сезімталдығы

Жалпы алғанда, әзірленген әдістің селективтілігін анықтау үшін осы зерттеуде алманың төрт түрлі саңырауқұлақ патогендері қолданылды: *Cytospora* түрлері (*Cytospora sorbina*, *Cytospora parasitica*, *Cytospora pruinosus* және *Cytospora chrysosperma*), *Eutypa lata*, *Alternaria alternata* және *Fusarium graminearum*. Сезімталдық сынағына келетін болсақ, бір *Cytospora parasitica* изолятынан (AC-106, Алматы, Қазақстан) алынған геномдық ДНҚ әзірленген электрохимиялық биосенсор әдісінің сезімталдығын тексеру үшін 10 нг-нан 1 фг-ға дейінгі диапазонда сериялық түрде 10 есе сұйылтылған.

Нәтижелер және талқылау

Алма ағашының цитоспороз ауруының ерте диагностикасы үшін әзірленген әдістің негізгі принципі ДНҚ мен алтын беті арасындағы аффинді әрекеттесу арқылы электрохимиялық әдісті пайдалана отырып, оқшауланған және тазартылған ДНҚ-ны анықтауға негізделген. Қысқаша айтқанда, әдіс биотин-стрептавидин әрекеттесулері арқылы мақсатты ДНҚ тізбегіне селективті түрде байланысатын стрептавидинмен қапталған

магниттік моншақтарға бекітілген биотинделген комплементарлы функционалдық ұстау зондтарын пайдалануды қамтиды. Ұсталған ДНҚ нысандары содан кейін магниттік жуу қадамдары арқылы тазартылады және қыздыру арқылы ұстау зондтарынан босатылады. Шығарылған ДНҚ тізбегі ДНҚ мен алтын беті арасындағы аффинді әрекеттесуі арқылы SPGE-нің жалаң алтын бетіне тікелей адсорбцияланды. Содан кейін мақсатты ДНҚ мөлшері $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ тотықсыздандырғыш жұбы арқылы түзілген токты өлшеу арқылы анықталды. Мұндай редокс-жұптың сигналы электрод бетіндегі ДНҚ мөлшері мен қабат тығыздығына тәуелді, сондықтан ол ДНҚ гибридизациясын немесе адсорбциясын жанама бағалауға мүмкіндік береді [20,28].

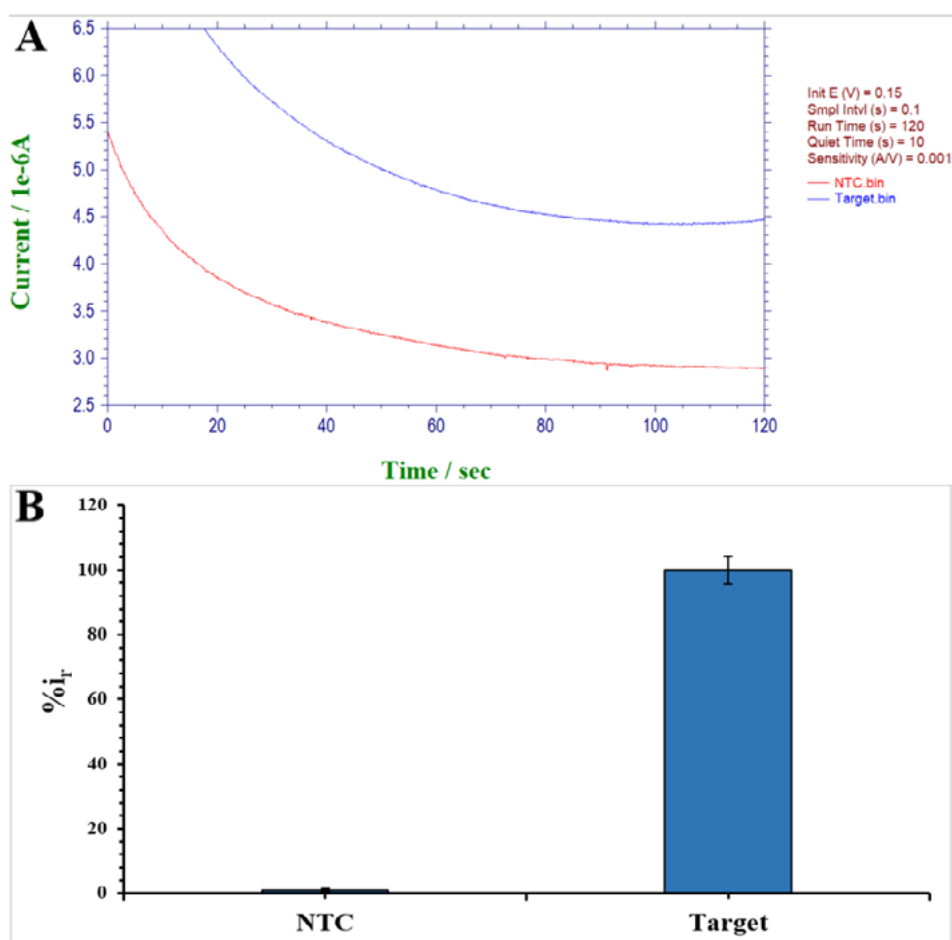
Осыған ұқсас әдістің жасалуы осыған дейін сипатталған болатын [22,24]. Бұл зерттеулердің авторлары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ тотықсыздану жүйесін алтын бетіне бекітілген нуклеин қышқылдарының санын өлшеу үшін қолдануға болатынын көрсетті. Зерттеулерде қатерлі ісікке қатысты mRNA және HOTAIR lncRNA биомаркерлерін анықтауға арналған электрохимиялық биосенсор әдістері әзірлеген. Бұл әдістер ПТР қолданбай-ақ немесе интерфейсті аффинді өзара әрекеттесуге негізделіп, биомаркерлерді биоүлгілерден жоғары сезімталдықпен және де тиімді түрде анықтауға мүмкіндік беріп отыр. Басқа зерттеу [20] $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ жүйесі теріс зарядталған нуклеин қышқылы мен электрод беті арасындағы кері итеруді, әсіресе нуклеин қышқылының тығыздығы төмен болған кезде тиімді жеңе алатынын хабарлады. Жұмыста ДНҚ гибридизациясы арқылы алтын электродтарының электрокаталитикалық белсенділігін қосу мүмкіндігі зерттеліп, ол электродтардың бетіне бекітілген ДНҚ зондтары мен нысана-ДНҚ-ның гибридизациясы қолданылып, пайда болған өзгеріс электрохимиялық немесе электрокаталитикалық сигнал арқылы анықталған. Яғни, алтын электрод сигналды күшейтетін электрокаталитикалық платформа ретінде пайдаланылған.

Біздің биосенсордың ең жақсы аналитикалық өнімділігіне қол жеткізу үшін адсорбция уақытын қоса алғанда, ДНҚ-алтын адсорбция кинетикасына әсер ететін әртүрлі параметрлер оңтайландырылды. Инкубация уақытын оңтайландыру әсіресе маңызды, себебі ұзағырақ уақыт электрод бетінің қанығуына әкелуі мүмкін.

Диагностикалық қолданбаларда биосенсордың бір-бірімен тығыз байланысты нысандарды ажыратуы өте маңызды. Бұл мүмкіндікті тексеру үшін әдістің өнімділігі бірдей шарттарда бақылау эксперименттерін жүргізу арқылы селективтілікке бағаланды. Бастапқыда әдістің іске жарамдылығын анықтау үшін мақсатты ДНҚ үлгісінің орнына фосфат буферінің ерітіндісін пайдалану арқылы функционалдық/үлгісіз бақылау (NTC) эксперименті орындалды, нәтижесінде NTC үшін ток тығыздығының минималды реакциясы алынды (Сурет 1А-В).

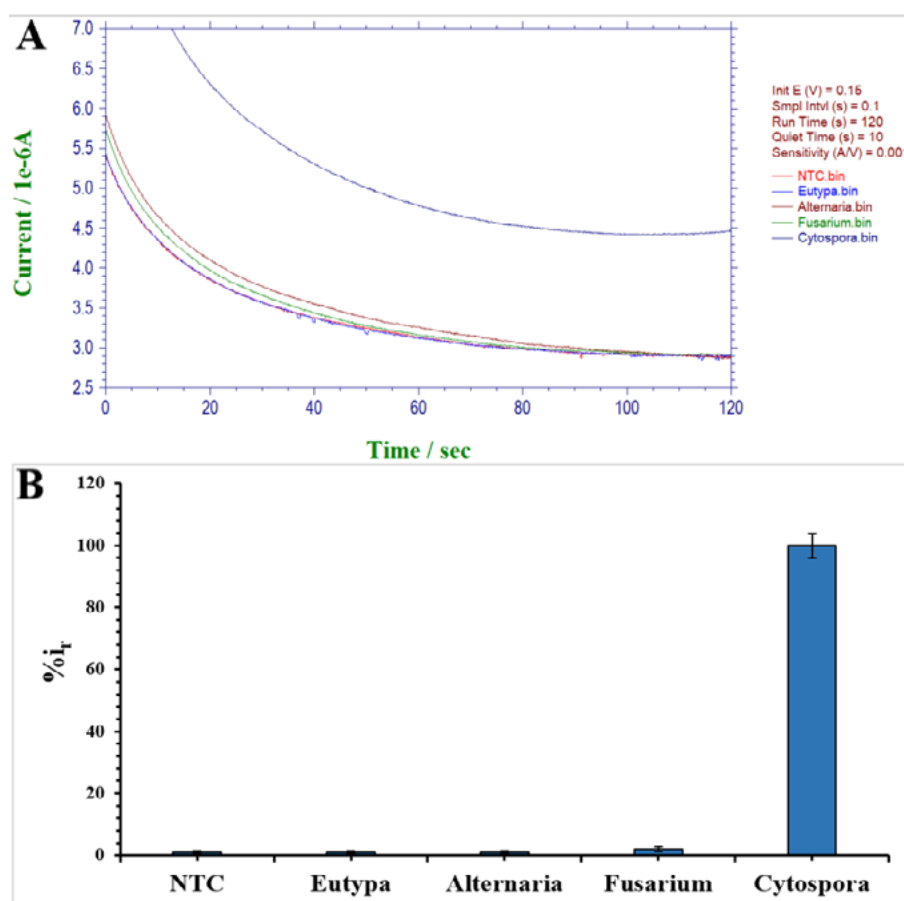
Сурет 1А нәтижелері мақсатты ДНҚ болған жағдайда хроноамперометриялық токтың NTC бақылауымен салыстара қарастырғанда айқын төмендейтіндігін көрсетеді. Бұл мақсатты ДНҚ-ның алтын электрод бетіне тиімді адсорбцияланып, теріс зарядталған ДНҚ мен феррицианид/ферроцианид редокс жүйесі арасындағы кулондық тебілу әсерінен электрондардың тасымалдануының тежелуімен түсіндіріледі. Сурет 1В-де көрсетілгендей, мақсатты ДНҚ үшін салыстырмалы ток жауабы шамамен 100 %-ға жетсе, NTC үлгісінде бұл көрсеткіш нөлге жуық мәнінде сақталады, ол деген жалған оң сигналдың байқалмағанын дәлелдейді.

Зерттеуден алынған нәтижелер биосенсордың мақсатты ДНҚ-ға жоғары селективтілікпен жауап бергендігінің және диагностикалық талдау кезінде сенімді ажырату қабілетіне ие екенін растайды.



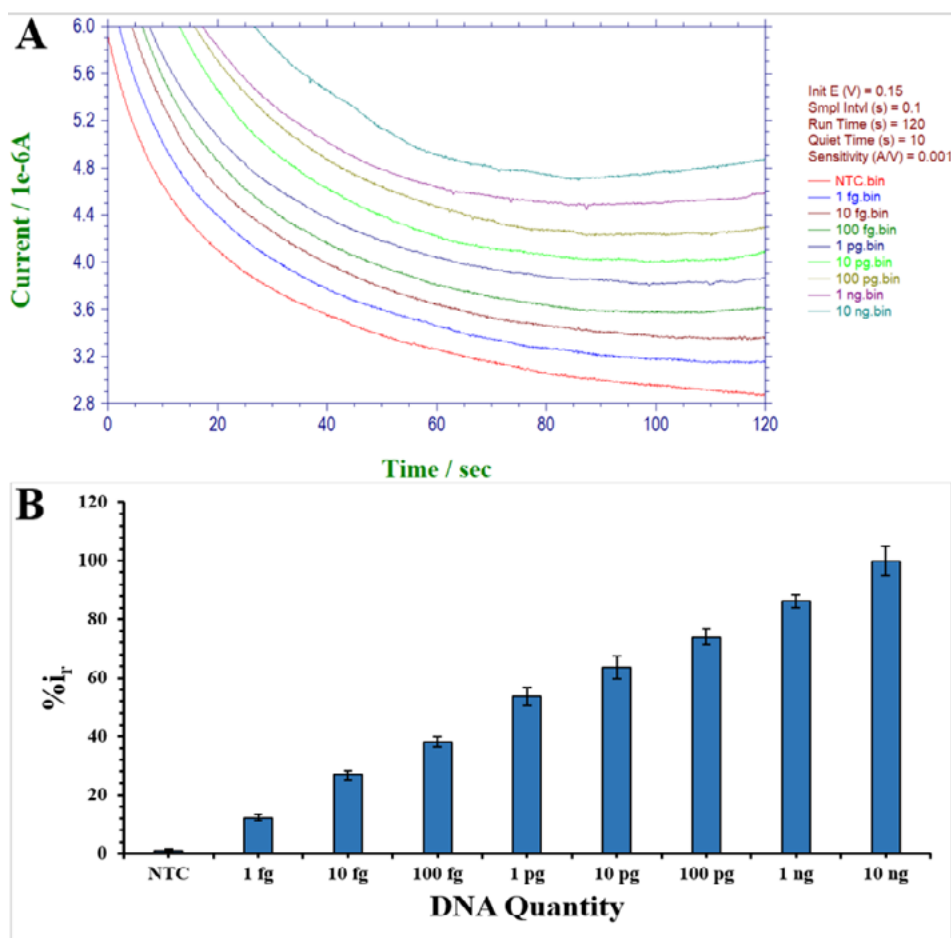
Сурет 1. Әдістің іске жарамдылығы. (А) Мақсатты ДНҚ және үлгісіз сынақ (NTC) үшін ДИВ ағымдағы жауаптары. (В) Мақсатты ДНҚ және NTC үшін сәйкес келетін ағымдағы жауап өзгерістері. Қате жолақтары үш техникалық қайталаудың стандартты ауытқуын білдіреді.

Содан кейін мақсатты ДНҚ тізбегімен қоса басқа да үш алма саңырауқұлақ қоздырғыштарының (*Eutypa lata*, *Alternaria alternata* және *Fusarium graminearum*) әрқайсысынан 1 нг соңғы мөлшерде алынған байланыссыз және комплементарлы емес геномдық ДНҚ тізбектері қолданылды және алынған ағымдағы жауап өзгерісі нәтижелері салыстырылды. (Сурет 2А-В). Сурет 2А-да мақсатты *Cytospora* ДНҚ үлгісіне сәйкес токтың айқын жоғары деңгейде сақталғаны, ал комплементарлы емес ДНҚ үлгілерінде ток мәндерінің біртіндеп төмендеп, NTC деңгейіне жақындай бастағаны байқалады. Сурет 2В нәтижелері бұл айырмашылықты сандық түрде растап, *Cytospora* үлгісінде салыстырмалы ағымдағы жауаптың шамамен 100% -ға жеткенін, ал *Eutypa lata*, *Alternaria alternata* және *Fusarium graminearum* үлгілерінде оның өте төмен деңгейде қалғанын көрсетті. Осылайша, мақсатты және комплементарлы емес ДНҚ үлгілері арасындағы айқын сигнал айырмашылығы биосенсордың жоғары селективтілігін және *Cytospora* қоздырғышының ДНҚ-сын басқа алма ағашының патогенді саңырауқұлақтарының ДНҚ-сынан тиімді ажырату мүмкіндігін дәлелдейді.



Сурет 2. Әдіс селективтілігі. (А) Мақсаттың ДНҚ тізбегі үшін ДИВ ағымдағы жауаптары: *Cytospora* түрлерін басқа үш алма саңырауқұлақтарымен салыстырғанда: *Eutypa lata*, *Alternaria alternata* және *Fusarium graminearum*. (В) Төрт саңырауқұлақ ДНҚ тізбектері үшін сәйкес келетін ағымдағы жауап өзгерістері. Қате жолақтары үш техникалық қайталаудың стандартты ауытқуын білдіреді.

Осы үш комплементарлы емес ДНҚ үшін салыстырмалы ДИВ ағымдағы жауабы (%i_r) 4%-дан аз болды, бұл мақсатты ДНҚ үшін алынған ДИВ жауабымен салыстырғанда шамамен 20 есе төмен болды. Маңыздысы, осы комплементарлы емес нысандардан алынған жауаптар NTC-ге ұқсас болды, бұл әдістің мақсатты ДНҚ-ны анықтау үшін жеткілікті селективтілігі бар екенін көрсетеді.



Сурет 3. Сезімталдық деректерін талдау. (А) 10 нг-нан 1 фг-ға дейінгі ДНҚ-ның бастапқы шамалары үшін ДИВ ағымдағы жауаптары. (В) Анықтау шегі 1 фг болатын сезімталдық сынағы үшін жасалған стандартты қисық. NTC үлгісіз сынақты білдіреді. Қате жолақтары үш техникалық қайталаудың стандартты ауытқуын білдіреді.

Әдістің сезімталдығы 10 нг-нан 1 фг-ға дейінгі әртүрлі мөлшердегі таза саңырауқұлақ ДНҚ-сын талдау арқылы зерттелді. Мақсатты ДНҚ саны ұлғайған сайын, электрод бетіндегі теріс зарядталған ДНҚ-мен кулондық әрекеттесу нәтижесінде $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ кері итерілуі байқалды. Бұл Сурет 3А-В көрсетілгендей, NTC-мен салыстырғанда Фарадалық токтың төмендеуіне және ағымдағы жауап өзгерістерінің жоғарылауына әкелді. Аталмыш әдіс үш тәуелсіз эксперимент үшін 7%-дан аз салыстырмалы стандартты ауытқумен жақсы қайталану мүмкіндігін көрсетті. Сондай-ақ, жаңа әдіс 1 фг анықтау шегін көрсетті, бұл шамамен 2.48×10^{-2} геномды көшіру санына тең. Бұл нәтиже өсімдік патогендерін анықтау үшін осыған дейін әзірленген сандық ПТР негізіндегі әдістерге қарағанда 100 есе сезімтал [29-31]. Сондықтан, 1 фг ең төмен анықталатын концентрациясы бар бұл биосенсор әдісі цитоспороз қоздырғыштарын ерте анықтау үшін сенімді құрал бола алады.

Қорытынды

Бұл зерттеу алма ағаштарын зақымдайтын цитоспороз қоздырғыштарын ерте және сандық анықтау үшін дәстүрлі диагностикалық әдістемелерді алмастыру мүмкіндігі бар электрохимиялық биосенсор әдісін сипаттайды. Электрохимиялық платформа

технологиялары жоғары сезімталдық пен төмен бағаға байланысты жоғары сұранысқа ие. Дегенмен, әдістің жеңілдігі мен селективтілігін оңтайландыру үшін әлі де қосымша зерттеулер жүргізілуі қажет. Әдістің инкубация уақытының жақсаруына және жоғары сезімталдығына қарамастан, жалпы талдау уақытын қысқарту және анықтау өнімділігінің күрделілігін болдырмау үшін магниттік оқшаулау және электрод бетін өзгерту қадамдарын оңтайландыру қажет. Бұдан басқа, әзірленген электрохимиялық биосенсор әдісінің селективтілігінің жоғары деңгейін қамтамасыз ету үшін коммерциялық бақтарда цитоспороз қоздырғыштарымен қатар табылатын алма ағашының саңырауқұлақ патогендерінің кеңірек панелінде қосымша сынақтар жасау жоспарлануда.

Авторлардың үлесі

К.Д. – мәтіннің бастапқы нұсқасын жазу; **С.Н., Д.У.** – эксперименттерді жүргізу; **З.У., Ш.А., Г.С.**, – эксперимент нәтижелерін талдау; **К.Д., Г.М.**, – зерттеудің тұжырымдамасы мен дизайнын әзірлеу; **Ж.Т.** - жұмысты басқару, мақаланың мәтінін редакциялау және соңғы толықтау.

Қаржыландыру

Бұл зерттеуді Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім Министрлігінің ғылым комитеті қаржыландырды (грант №AP19680152).

Мүдделер қақтығысы

Авторлар мүдделер қақтығысының жоқтығын мәлімдейді.

Этикалық стандарттарды сақтау.

Авторлар жұмыстың барлық кезеңдері мен аспектілеріне жауапты, сонымен қатар кез келген бөлігінің дұрыстығы мен тұтастығына қатысты туындаған мәселелерді қарастырып, шешу жолдарын қамтамасыз етеді.

Әдебиеттер тізімі:

1. Guiné, R.P., Barroca, M.J., Coldea, et.al., 2021. Apple fermented products: An overview of technology, properties and health effects. *Processes*, 9(2), p.223. <https://doi.org/10.3390/pr9020223>
2. Oyenih, A.B., Belay, Z.A., Mditshwa, A. et.al., 2022. “An apple a day keeps the doctor away”: The potentials of apple bioactive constituents for chronic disease prevention. *Journal of food science*, 87(6), pp.2291-2309. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16155>
3. Feng, S., Yi, J., Li, X., et.al., 2021. Systematic review of phenolic compounds in apple fruits: Compositions, distribution, absorption, metabolism, and processing stability. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(1), pp.7-27. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05481>
4. Gupta, S. and Saxena, S., 2023. Endophytes: Saviour of apples from post-harvest fungal pathogens. *Biological Control*, 182, p.105234. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105234>
5. Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, et.al., 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, 3(3), pp.430-439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
6. Du, Y., Jia, H., Yang, Z., et.al., 2023. Sufficient coumarin accumulation improves apple resistance to *Cytospora mali* under high-potassium status. *Plant Physiology*, 192(2), pp.1396-1419. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad184>

7. Wang, X., Shi, C.M., Gleason, M.L., et.al., 2020. Fungal species associated with apple Valsa canker in East Asia. *Phytopathology Research*, 2(1), p.35. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00076-5>
8. Lawrence, D.P., Holland, L.A., Nouri, M.T., et.al., 2018. Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination. *IMA fungus*, 9(2), pp.333-369. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2018.09.02.07>
9. Tulegenova, Z., Amanbayeva, U., Shalabayeva, A.M., et.al., 2025. Identification and Pathogenicity of Causal Agents of Apple Canker Disease in Kazakhstan. *Horticulturae*, 11(1), p.45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11010045>
10. Zang, R., Yin, Z., Ke, X., et.al., 2012. A nested PCR assay for detecting *Valsa mali* var. *mali* in different tissues of apple trees. *Plant Disease*, 96(11), pp.1645–1652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0387-RE>
11. Meng, X.L., Qi, X.H., Han, Z.Y., et.al., 2019. Latent infection of *Valsa mali* in the seeds, seedlings and twigs of crabapple and apple trees is a potential inoculum source of *Valsa* canker. *Scientific Reports*, 9, p.7738. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44228-w>
12. Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., et.al., 2015. Advanced methods of plant disease detection. A review: F. Martinelli et al. *Agronomy for sustainable development*, 35(1), pp.1-25. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>
13. Dyussembayev, K., Sambasivam, P., Bar, I., et.al., 2021. Biosensor technologies for early detection and quantification of plant pathogens. *Frontiers in Chemistry*, 9, p.636245. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.636245>
14. Kanapiya, A., Amanbayeva, U., Tulegenova, Z., et.al., 2024. Recent advances and challenges in plant viral diagnostics. *Frontiers in Plant Science*, 15, p.1451790. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1451790>
15. Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, et.al., 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), pp.739-742. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>
16. Dyussembayev, K., Akpe, V., Yechshzhanov, T., Cheesman, et.al., 2024. Amplification-free detection of *Ascochyta* blight in chickpea using a simple molecular beacon assay. *Scientific Reports*, 14(1), p.23846. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74564-5>
17. Ward, E., Foster, S.J., Fraaije, B.A., et.al., 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145(1), pp.1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x>
18. Vincelli, P. and Tisserat, N., 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease*, 92(5), pp.660–669. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-5-0660>
19. Lau, H.Y., Wu, H., Wee, E.J.H., et.al., 2017. Specific and sensitive isothermal electrochemical biosensor for plant pathogen DNA detection with colloidal gold nanoparticles as probes. *Scientific Reports*, 7, p.38896. <https://doi.org/10.1038/srep38896>
20. Drummond, T.G., Hill, M.G. Barton, J.K., 2003. Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology*, 21(10), pp.1192–1199. <https://doi.org/10.1038/nbt873>
21. Cesewski, E. and Johnson, B.N., 2020. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 159, p.112214. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214>
22. Islam, M.N., Gopalan, V., Haque, M.H., et.al., 2017. A PCR-free electrochemical method for messenger RNA detection in cancer tissue samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 98, pp.227-233. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.051>

23. Haque, M.H., Islam, M.N., Islam, F., et.al., 2017. Electrochemical Detection of FAM134B Mutations in Oesophageal Cancer Based on DNA-Gold Affinity Interactions. *Electroanalysis*, 29(5), pp.1359-1367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821184-7.00024-4>
24. Clack, K., Soda, N., Kasetsirikul, S., et.al., 2022. An interfacial affinity interaction-based method for detecting HOTAIR lncRNA in cancer plasma samples. *Biosensors*, 12(5), p.287. <https://doi.org/10.3390/bios12050287>
25. Koo, K.M., Sina, A.A., Carrascosa, L.G., et.al., 2015. DNA-bare gold affinity interactions: mechanism and applications in biosensing. *Analytical Methods*, 7(17), pp.7042-7054. <https://doi.org/10.1039/C5AY01479D>
26. Tulegenova, Z., Nayekova, S., Zhaxylykov, A., et.al., 2025. Phylogenetic and pathogenic characterization of *Cytospora* species causing apple canker in Kazakhstan. *Agriculture*, 15(23), p.2490. <https://doi.org/10.3390/agriculture15232490>
27. Chomczynski, P. and Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 1(2), pp.581-585. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
28. Zhang, J., Wang, L., Pan, D., et.al., 2007. DNA hybridization “turns on” electrocatalysis at gold electrodes. *Chemical Communications*, (11), pp.1154-1156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201551109>
29. Dobhal, S., Santillana, G., Stulberg, M.J., et.al., 2025. Development and validation of genome-informed and multigene-based qPCR and LAMP assays for accurate detection of *Dickeya solani*: a critical quarantine pathogen threatening the potato industry. *Microbiology Spectrum*, 13(1), pp.e00784-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00784-24>
30. Drais, M.I., Turco, S., Morales-Rodríguez, C., et.al., 2025. Enhanced TaqMan qPCR Assay for *Phytophthora cinnamomi* Detection and Quantification. *Forest Pathology*, 55(2), p.e70012. <https://doi.org/10.1111/efp.70012>
31. Lee, S., Kim, W.J., Chung, M., 2021. Enhanced electrochemical biosensing on gold electrodes with a ferri/ferrocyanide redox couple. *Analyst*, 146(17), pp.5236–5244. <https://doi.org/10.1039/D1AN00952D>

Электрохимический биосенсорный метод для диагностики цитоспороза яблони

К. Дюсембаев¹, А. Спанбаев², Д. Утеулиева³, Г. Салхожаева⁴, З. Умирбаева⁵,
С. Наекова⁶, Г. Мукиянова⁷, Ж. Тулегенова^{8*}

^{1,2,4,6,8} Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилёва, Астана, Казахстан

^{1,6,8} Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан

³ Западно-Казахстанский университет имени М. Утемисова, Уральск, Казахстан

⁵ Каспийский государственный университет технологий и инжиниринга
имени Ш. Есенова, Актау, Казахстан

⁷ Университет Шакарима, Семей, Казахстан

Аннотация. Яблоня является одним из наиболее широко выращиваемых плодовых деревьев, а цитоспороз — это заболевание, вызывающее опухание и отмирание ветвей. Лечение этого заболевания в основном проводится с помощью фунгицидов. Однако чрезмерное использование химикатов оказывает существенное влияние на качество плодов и окружающую среду, а также экономически невыгодно для стран с небольшим производством яблок. Проблему можно решить, разработав стратегию управления, основанную на

своевременной диагностике заболевания и предотвращении его распространения. Поэтому существует потребность в надежном и недорогом диагностическом инструменте, который можно использовать для раннего обнаружения и количественной оценки патогена. Хотя для этой цели имеется несколько обычных лабораторных тестов, им не хватает простоты и селективности, а самое главное, они требуют обученного персонала. В этой статье описывается разработка электрохимического биосенсорного метода, который может заменить обычные молекулярные методы обнаружения. Этот метод в сто раз чувствительнее существующих количественных ПЦР методов.

Ключевые слова: цитоспороз, яблоко, диагностика заболеваний, электрохимический биосенсор, ДНК-золотое аффинное взаимодействие

An electrochemical biosensor assay for diagnostics of *Cytospora* canker disease in apple trees

K. Dyussembayev¹, A. Spanbayev², D. Uteulieva³, G. Salkhozhayeva⁴,
Z. Umirbayeva⁵, S. Naekova⁶, G. Mukiyanova⁷, Zh. Tulegenova^{8*}

^{1,2,4,6,8} L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

^{1,6,8} National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

³ M. Utemisov West Kazakhstan University, Uralsk, Kazakhstan

⁵ Yessenov University, Aktau, Kazakhstan

⁷ Shakarim University, Semey, Kazakhstan

Abstract. Apple is one of the most widely grown fruit trees, and *Cytospora* canker is a disease that causes branch canker and dieback. The treatment of the disease is mainly carried out by using fungicides. However, excessive use of chemicals has a significant impact on fruit quality, as well as on the environment, and is also economically unprofitable for countries with small apple production. The problem can be solved by establishing a management strategy based on timely diagnosis of the disease and preventing its spread. Therefore, there is a need for a reliable and inexpensive diagnostic tool that can be used for early detection and quantification of the pathogen. Although there are several conventional laboratory tests for this purpose, they lack simplicity and selectivity, and most importantly, require trained personnel. This article describes the development of an electrochemical biosensor method that can replace conventional molecular detection methods. This method is a hundred times more sensitive than existing quantitative PCR methods.

Keywords: *Cytospora* canker, apple, disease diagnostics, electrochemical biosensor, DNA-gold affinity interactions

Авторлар туралы мәліметтер:

Дюсембаев Казбек Амзеұлы – PhD, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің биотехнология және микробиология кафедрасының доцент м.а., 010000, Астана, Қазақстан; Ұлттық биотехнология орталығының биоалуантүрлілік және генетикалық ресурстар зертханасының ғылыми қызметкері, 010000, Астана, Қазақстан.

Спанбаев Айдар Демеубайұлы – Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Жалпы биология және геномика кафедрасының PhD, қауымдастырылған профессоры, Астана, 010000, Қазақстан.

Утеулиева Дәмелі Танатаровна – биология ғылымдарының кандидаты, М.Өтемісов атындағы Батыс Қазақстан университеті, Назарбаева көш, 162, Орал, 090000, Қазақстан.

Салхожаева Гаухар Мадыхановна – қауымдастырылған профессор (доцент), биология ғылымдарының кандидаты, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, 010000, Астана, Қазақстан.

Умирбаева Зоя Чекебаевна – биология ғылымдарының кандидаты, Ш.Есенов атындағы Каспий технологиялар және инжиниринг университеті, Жаратылыстану кафедрасының қауымдастырылған профессоры, 130000, Ақтау, Қазақстан.

Наекова Салтанат Кубеевна – биология магистрі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің биотехнология және микробиология кафедрасының аға оқытушысы, 010000, Астана, Қазақстан; Ұлттық биотехнология орталығының биоалуантүрлілік және генетикалық ресурстар зертханасының ғылыми қызметкері, 010000, Астана, Қазақстан.

Мукиянова Гүлжамал Слямғазықызы – PhD, «Шәкәрім университеті» Коммерциялық емес акционерлік қоғамы биотехнология кафедрасының ғылым профессоры, 071412, Семей, Қазақстан.

Тулегенова Жанар Асанбаевна – хат-хабар авторы, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің биотехнология және микробиология кафедрасының доцент м.а., 010000, Астана, Қазақстан; Ұлттық биотехнология орталығының биоалуантүрлілік және генетикалық ресурстар зертханасының аға ғылыми қызметкері, 010000, Астана, Қазақстан.

Сведения об авторах:

Дюсембаев Казбек Амзеұлы – PhD, и.о. доцента кафедры биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000, Астана, Казахстан; научный сотрудник лаборатории биоразнообразия и генетических ресурсов, Национальный центр биотехнологии, 010000, Астана, Казахстан.

Спанбаев Айдар Демеубаевич – PhD, ассоциированный профессор кафедры общей биологии и геномики, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилёва, Астана, 010000, Казахстан.

Утеулиева Дамели Танатаровна – кандидат биологических наук, Западно-Казахстанский университет им. М. Утемисова, 090000, Уральск, Казахстан.

Салхожаева Гаухар Мадыхановна – ассоциированный профессор (доцент), кандидат биологических наук, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000, Астана, Казахстан.

Умирбаева Зоя Чекебаевна – кандидат биологических наук, Ассоциированный профессор кафедры Естественные науки, Каспийский государственный университет технологий и инжиниринга имени Ш. Есенова, 050000, Ақтау, Казахстан.

Наекова Салтанат Кубеевна – магистр биологии, старший преподаватель кафедры биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000, Астана, Казахстан; научный сотрудник лаборатории биоразнообразия и генетических ресурсов, Национальный центр биотехнологии, 010000, Астана, Казахстан.

Мукиянова Гүлжамал Слямгазиевна – доктор PhD, профессор кафедры биотехнологии, Некоммерческое акционерное общество «Шәкәрім Университет», 071412, Семей, Казахстан.

Тулегенова Жанар Асанбаевна – автор-корреспондент, и.о. доцента кафедры биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000, Астана, Казахстан; старший научный сотрудник лаборатории биоразнообразия и генетических ресурсов, Национальный центр биотехнологии, 010000, Астана, Казахстан.

Authors' information:

Kazbek Dyuyssembayev – PhD, Associate Professor, Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 010000, Astana, Kazakhstan; Researcher at the Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 010000, Astana, Kazakhstan.

Aidar Spanbayev – PhD, Associate Professor, Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, 010000, Kazakhstan.

Dameli Uteulieva – Candidate of Biological Sciences, M. Utemisov West Kazakhstan University, 090000, Uralsk, Kazakhstan

Gaukhar Salkhozhayeva – Associate Professor, Candidate of Biological Sciences, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 010000, Astana, Kazakhstan.

Zoya Umirbayeva – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Yessenov University, 130000, Aktay, Kazakhstan.

Saltanat Nayekova – Master of Biology, Senior Lecturer, Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 010000, Astana, Kazakhstan; Researcher at the Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 010000, Astana, Kazakhstan.

Gulzhamal Mukiyanova – PhD, Science Professor, Department of Biotechnology, Non-profit Joint Stock Company “Shakerim University”, 071412, Semey, Kazakhstan.

Zhanar Tulegenova – Corresponding Author, Associate Professor, Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 010000, Astana, Kazakhstan; Senior Researcher at the Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 010000, Astana, Kazakhstan.