

ZBIÓR RAPORTÓW NAUKOWYCH Pytania. Odpowiedzi. Hipotezy: nauka XXI stulecie Гданьск 30.05.2014 - 31.05.2014 Część 1	СБОРНИК НАУЧНЫХ ДОКЛАДОВ Вопросы. Ответы. Гипотезы: наука XXI век Gdańsk 30.05.2014 - 31.05.2014 Часть 1
--	--

УДК 72+7+7.072+61+082
ББК 94
Z 40

Wydawca: Sp. z o.o. «Diamond trading tour»

Druk i oprawa: Sp. z o.o. «Diamond trading tour»

Adres wydawcy i redakcji: 00-728 Warszawa, ul. S. Kierbedzia, 4 lok.103
e-mail: info@conferenc.pl

Cena (zł.): bezpłatnie

Zbiór raportów naukowych.

Z 40 Zbiór raportów naukowych. „Pytania. Odpowiedzi. Hipotezy: nauka XXI stulecie„. (30.05.2014 - 31.05.2014) - Warszawa: Wydawca: Sp. z o.o. «Diamond trading tour», 2014. - 84 str.
ISBN: 978-83-64652-35-6 (t.1)

Zbiór raportów naukowych. Wykonane na materiałach Międzynarodowej Naukowo-Praktycznej Konferencji 30.05.2014 - 31.05.2014 roku. Gdańsk.
Część 1.

УДК 72+7+7.072+61+082
ББК 94

Wszelkie prawa zastrzeżone.

Powielanie i kopiowanie materiałów bez zgody autora jest zakazane.

Wszelkie prawa do materiałów konferencji należą do ich autorów.

Pisownia oryginalna jest zachowana.

Wszelkie prawa do materiałów w formie elektronicznej opublikowanych w zbiorach należą Sp. z o.o. «Diamond trading tour».

Obowiązkowym jest odniesienie do zbioru.

Warszawa 2014

ISBN: 978-83-64652-35-6 (t.1)



"Diamond trading tour" ©

Власов В.В.
д. с-г. н., член-кор НААН України, директор
Конуп Л.О.
к.б.н., зав.лаб. вірусології і мікробіології
Чистякова В.Л.
науковий співробітник
Конуп А.І.
молодший науковий співробітник
Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства
ім. В.Є. Таїрова», Одеса, Україна

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ ВИНОГРАДУ МЕТОДАМИ ІФА ТА ПЛР

Через вірусні і бактеріальні хвороби винограду великих збитків зазнають усі регіони з розвинутим виноградарством, в тому числі – південь України. Відомо, що виноградарство світу кожен рік втрачає приблизно 10 % врожаю від ураження вірусними хворобами, 15 % від ураження збудником бактеріального раку винограду і 45 % від ураження фітоплазмозом інфекцією [1, 4].

Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє розпізнати кущі з латентною інфекцією і запобігти заготовленню з них лози для вегетативного розмноження рослин. Метод полімеразної ланцюгової реакції дозволяє у швидкі строки визначити наявність пухлиноутворюючих бактерій в лозі, корінні винограду, ґрунті, інфікованість кущів винограду фітопатогенними вірусами і ідентифікувати фіто плазмозову інфекцію [2, 3, 4, 5].

Метою даної роботи було дослідження ступеню ураженості збудниками бактеріального раку, вірусних захворювань і фітоплазмозової інфекції садивного матеріалу та рослин винограду, як складову санітарного контролю маточних насаджень і садивного матеріалу.

Матеріал та методи дослідження. На інфікованість пухлиноутворюючими агробактеріями, фітовірусами і фітоплазмозом інфекцією впродовж 2008-2009 років досліджувалися п'ять клонів підщепних сортів *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ, *V. berlandieri* x *V. riparia* СО₄, *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 (господарства Одеської області), рядовий садівний матеріал прищепних сортів Шардоне, Каберне Совінйон, (господарства Одеської області), Рислінг рейнський, Мускат гамбургський, Італія (Югославія). Виділення збудника бактеріального раку з іздерев'янілої лози винограду проводили згідно методу Лехоцької [7] з висівом на напівселективне середовище Рой і Сасера (RSM) [8]. Після інкубації впродовж 5 – 7 днів при 25 °С колонії пересівали на скошений картопляний агар. ПЛР проводили з ДНК, виділеними з одноклубових культур шляхом теплового лізису бактеріальної суспензії [6]. Загальний об'єм реакційної суміші для проведення ПЛР становив 20 мкл, об'єм зразка – 5 мкл. У реакційну суміш вносили по 10 пмоль кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 2 Од Таq-полімерази, 2 мМ MgSO₄, 4 мкл буфера для проведення

ПЛР (5х). (Усі реагенти фірми „АмплиСенс”, Росія). Використовували праймери до послідовності *ipt* Ti-плазміді [8].

Позитивним контролем слугував патогенний штам *A. tumefaciens* FA2, люб'язно наданий доктором Т. J. Burr (Корнельський університет, США). Негативним контролем – дейонізована вода.

Ампліфікацію проводили згідно Haas et al. [9], збільшивши час початкової денатурації – до 3-х хвилин [5], а температуру відпалу у процесі добору оптимальних параметрів ПЛР – до 52 °С.

Для тестування кущів клонів винограду на наявність GLRaV-1 та GLRaV-3 в серпні – вересні відбирали нижнє листя рослин, а для GFLV – верхнє листя. В листопад-грудні виділення вірусу проводили у здерев'янілих пагонах. Реакційна суміш для проведення зворотньої транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила дейонізовану воду, 10X ПЛР буфера (500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl, pH 9,0), сахарозу (20 %) і крезоловий червоний, 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), 0,1 М дитіотриетолу (ДТТ), 10 пмоль кожного праймера, 1,25 Од Таq-полімерази, 8 Од ревертази («АмплиСенс», Росія), 1,5 мМ MgSO₄. Для тестування на присутність GFLV концентрація магнію була оптимізована і складала 1,3 мМ. Використовували наступні пари праймерів: CPV і CPC (GLRaV-1), C 547 і H 229 (GLRaV-3), oligoC1 і oligoV1 (GFLV). У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

В якості позитивного контролю використовували інфікований вірусами коротковузли і скручування листя матеріал винограду, люб'язно наданий доктором D. Boscia (Барійський університет, Італія). В якості негативного контролю використовували дейонізовану воду.

Зворотню транскрипцію проводили у термостаті при 52 °С протягом 30 хвилин. Ампліфікація включала 35 циклів (94 °С – 30 сек, 56 °С – 45 сек, 72 °С – 60 сек), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хвилин (Rowhani A., особисте повідомлення). Для GLRaV-1 в ході дослідження температура відпалу була зменшена до 53 °С, а для GFLV збільшена до 61 °С.

Ідентифікацію фітоплазмозової інфекції проводили за допомогою ПЛР з універсальною парою праймерів до різних ділянок геному, специфічною для фітоплазм fU5/rU3. Для збільшення виходу продукту ПЛР проводили дві ампліфікації, оскільки після першої візуально продукт ПЛР не спостерігався.

Деякі параметри ПЛР, а саме температури відпалу для окремих праймерів і зміст реакційних сумішей, були модифіковані з метою поліпшення результатів ампліфікації.

Реакцію проводили у програмувальному термостаті „Терцик” фірми „ДНК – Технологія” (Росія). Електрофорез проводили в 1,5 % агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-боратного буфера для електрофорезу („АмплиСенс”, Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми „Samsung” в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркер 800 – 200 і 2100-150 пар основ („АмплиСенс”, Росія).

Для ІФА використовували діагностичні набори фірми «AgriTest» (Італія). ІФА проводили згідно з рекомендаціями цієї фірми. Для виявлення GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV застосовували “сендвіч”-метод ІФА.

Результати та їх обговорення. В ході дослідження нами був встановлений відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської області. Всього було протестовано 104 куща клонів винограду. Сорти *V. berlandieri* x *V. riparia* CO₄, *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 Встановлено, що *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ в 5,8 % випадків був уражений збудником бактеріального раку винограду. Аналізували рядовий садівний матеріал прищепних сортів: Шардоне, Каберне Совіньон, (господарства Одеської області), Ріслінг рейнський, Мускат гамбургський, Італія (Югославія) Всього було протестовано 100 кущів винограду.

Найбільш ураженими бактеріальним раком серед виявилися Каберне Совіньон і Ріслінг рейнський.

Дослідження кущів винограду на наявність вірусної інфекції показало, що деякі кущі сортів Мускат гамбургський і Італія мали латентну ураженість збудником скручування листя винограду, причому сорт Мускат гамбургський був інфікований вірусом скручування листя 3-го серотипу, а сорт Італія – 1-м та 3-м серотипами вірусу. Зразки сорту Ріслінг рейнський також містили збудника коротковузля винограду, на той час як клоновий матеріал сорту Каберне Совіньон виявився вільним від збудників даних вірусних інфекцій.

Ідентифікація фітоплазмової інфекції на сорті Шардоне показала, що даний сорт уражено збудником почорніння деревини, що не є карантинною хворобою і не перевіряється карантинними службами.

Подальші дослідження у даному напрямку дозволять зробити висновки про поширеність бактеріального раку, скручування листя, коротковузля і фітоплазмової інфекції на виноградниках і розробити заходи щодо захисту винограду від цих шкодочинних хвороб винограду.

Література

1. Lee I.M., Hammond R.W., Davis R.E. & Gundersen D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834–842.
2. Rowhani A., Chay C., Golino D. A., Falk B. W. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue // *Phytopathology*. – 1993. – V. 83, № 7. – P. 749 – 753.
3. Burr T. J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // *Plant Dis.* – 1998. – V. 82. – P. 1288 – 1297.
4. Identification of the agent of grapevine fleck disease / [Boscia D., Martelli G. P., Savino V., Castellano M. A.] // *Vitis*. – 1991. – Vol. 30. – P. 97 – 105.
5. Esmenjaud D., Abad P. Detection of a region of the coat protein gene of grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode *Xiphinema index* // *Plant disease*. – 1994. – V. 78, № 11. – P. 1087 – 1090. Burr T. J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1999. – V. 37. – P. 53–80.
6. Bertaccini A., Mittempergher L., Vibio M. Identification of phytoplasmas associated with a decline of European hackberry (*Celtis ourstralis*) // *Ann. Appl. Biol.* – 1996. – Vol. 128. – P. 245–253.

7. Lehoczky J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines // *Vitis*. – 1971. – V. 10. – P. 215 – 221. Clark M. F., Bar-Joseph M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology // *Methods in virology*. – 1984. – № 7. – P. 51 – 85.
8. Roy M., Sasser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // *Phytopathology*. – 1983. – V. 73. – P. 810.
9. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // *Appl. Environm. Microbiol.* – 1995. – V. 61, № 8. – P. 2879 – 2884.