

ДІАГНОСТИКА ВІРУСІВ ПЛОДОВИХ КУЛЬТУР В УМОВАХ УКРАЇНИ

Методом ІФА ідентифіковано віруси ВХПЛЯ, ВЯДЯ, ВБДЯ, ВШС, ВХКП та ВНКП, досліджено їх поширення в різних типах насаджень, ступінь ураження різних сортів та підщеп плодових культур. Для ВХПЛЯ підібрано пару праймерів для діагностування за допомогою ПЛР.

Вірусні хвороби завдають значних збитків плодівництву. Інфіковані насадження плодових культур зменшують кількість та якість врожаю, знижується їх стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища [2].

Протягом останніх років вірусні хвороби плодових культур стали об'єктом інтенсивного вивчення майже в усіх країнах світу, що зумовлено їх широким розповсюдженням та високою шкодочинністю. Зважаючи на збитки, які завдають вірусні хвороби, основним напрямом розвитку садівництва в Україні є переведення його на безвірусну основу [1].

Метою нашого дослідження було вдосконалення методів імуно- та ПЛР-діагностики вірусів плодових культур, вивчення кількісного та якісного складу вірусних інфекцій та виявлення базових безвірусних клонів для подальшого розмноження і створення маточного фонду плодових культур в Україні.

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень слугували відібрані в 12 областях України зразки таких культур: зерняткових - яблуна, груша, айва; кісточкових - слива, алича, персик, черешня, вишня. Об'єктами досліджень були віруси зерняткових - хлоротичної плямистості листя яблуні - ХПЛЯ (ACLSV), борознистості деревини яблуні - БДЯ (ASGV), ямкуватості деревини яблуні - ЯДЯ (ASPV), мозаїки яблуні - ВМЯ (ArMV) та віруси кісточкових - шарки сливи - ВШС (PPV), хлоротичної кільцевої плямистості - ХКП (PDV), некротичної кільцевої плямистості - НКП (PNRV).

Методи дослідження передбачали попереднє тестування - візуальне обстеження за симптомами вірусних хвороб; діагностику натрав'янистих рослинах-індикаторах; імуноферментний аналіз вірусів (ELISA) та основне тестування - щеплення на міжнародних деревних індикаторах.

Візуальне обстеження плодівих насаджень на наявність вірусних хвороб проводили рано навесні за симптомами на першому молодому листі та в осінній період за симптомами на плодах.

Тестування на рослинах-індикаторах проводили за загальноприйнятими методиками відповідно до кожного вірусу.

Попереднє тестування здійснювали також методом імуноферментного аналізу. Досліджувані зразки тестували методом DAS-ELISA за стандартними методиками [3; 4]. Використовували діагностикуми виробництва НДІ плідівництва Молдови, ВСТИСП Росії та фірми «LOEWE» (Німеччина). Результати реєстрували на мікропланшетному автоматичному фотометрі «STAT FAX 2100» виробництва США.

Пошук та аналіз нуклеотидних послідовностей РНК вірусу ХПДЯ здійснювали шляхом підбору праймерів за допомогою комп'ютерної програми Oligo-6 [4].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної системи управління базами даних MS EXCEL 2000.

Результати та обговорення

При візуальному обстеженні насаджень виявляли віруси за такими симптомами: ВХПЛЯ - стрічковий візерунок на листках, деформація квіток; ВЯДЯ - відставання у рості, хлоротична крапчастість листя, ямкуватість деревини, ребристість плодів; ВБДЯ - розростання міжвузля, борознистість деревини індикаторних рослин; ВМЯ - мозаїка листя, яка переходить у некрози, на трав'янистих рослинах-індикаторах - зморшкуватість листків та відставання у рості; ВШС - концентричний хлороз та некроз листя, концентричні некротичні кільця та плями на плодах. Дослідження, проведені за вищезазначеними методами, дали змогу визначити загальний фітовірусологічний стан плодівих насаджень. Всього було протестовано 2929 зразків. Загальна інфікованість становила 7,3 %. Спостерігалася неоднорідність розподілу видового та кількісного складу вірусної інфекції залежно від культури, породи, сорту, типу та віку плодівих насаджень, що підтверджує результати попередніх досліджень [5]. Зокрема, рівень забруднення зерняткових культур у цілому становив 8,8 %. Найбільш ураженими виявилися сорти яблуні, які тривалий час використовуються у виробництві - 70,8 %, а саме: Ренет Симеренка, Голден Делішес, Слава Переможцям, Паніровка, Джонатан. Нові сорти яблуні вітчизняної селекції (Теремок, Едера,

Амулет, Тронка, Внучка та ін.) уражені на 45,0 %, а перспективні інтродуковані сорти (Лігол, Пріам, Еліза, Топаз та ін.) на 24,6 %. Найпоширенішими виявились віруси ХПЛЯ (91,5-26,4%) та ЯДЯ (40,2-15,3 %). У всіх діагностованих зразках сортів і підщеп зерняткових культур вірус мозаїки яблуні не виявлено.

Загальний рівень інфікованості кісточкових порід становив 17 %. Високий ступінь ураження вірусними хворобами виявили у старих маточниках вегетативних підщеп (91,5 %) та в колекційних садах (48,2 %) (див. табл.). Серед кісточкових найбільш ураженими були зразки сливи - 23,7 % (ВШС та ВНКП), найменш ураженими - зразки черешні - 3,6 %.

Таблиця. Результати ІФА-діагностики вірусів яблуні у різних типах насаджень (2004 р.)

Типи насаджень	Виявлені віруси (%)		
	хлоротична плямистість листя яблуні	борознистість деревини яблуні	ямкуватість деревини яблуні
Селекційні сади на вегетативних підщепах	38,1	6,9	15,3
Колекційні сади	48,2	15,2	28,0
Молоді маточники вегетативних підщеп	0	0	0
Старі маточники вегетативних підщеп	91,5	12,0	40,2
Маточно-живцеві сади	26,4	2,9	32,3

Оскільки ВХПЛЯ є досить шкодочинним, поширеним та у багатьох сортів перебуває в латентному стані, подальші наші зусилля було спрямовано на його виявлення за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Порівнюючи відомі штами вірусу, було виявлено консервативні ділянки, які містяться в гені капсидного білка. За допомогою програми Oligo-6 було підібрано пару праймерів: змістовий - TCATGGAAAG AC AGGGGCAA та антизмістовий - TAGACTTATAATAAATAGCCTGTA GACTT(РНС. 1).

Отже, у результаті діагностики вірусних хвороб плодівих культур було ідентифіковано віруси ХПЛЯ, ЯДЯ, БДЯ, ВШС, ХКП та НКП, досліджено їх поширення в різних типах насаджень, ступінь ураження різних сортів та підщеп плодівих сортів та підібрано пару праймерів для ПЛР-діагностики ВХПЛЯ.



Рис. 1. Нуклеотидна послідовність капсидного білка ВХПЛЯ та розташування праймерів

Васюта В. М., Удовиченко В. М. та ін. Перспективи створення сучасної системи вирощування безвірусного сертифікованого садівного матеріалу плодкових і ягідних культур в Україні // Садівництво: міжвидовий тематичний науковий зб. - К.: Аграрна наука, 2004. - Вип. 55.
 Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. - Кишинев: Штиинца, 1985. - С. 236-285.

Гнупова Р. В. Иммунологические исследования в вирусологии. - М.: Мир, 1986. - С. 185-280.
 Crowther J. R. ELISA. Theory and practice. - NY: Humana Press, 1995. - R 38-39.
 Udovichenko V. M., Kondratenko R. V. Diagnosis of apple virus diseases in the system of producing virus-free planting stock / International symposium 'Biotechnology approaches of exploitation and preservation of plant resources'. - Yalta, 2002. - P. 47-49.

A. Gospodarik, K. Udovichenko, V Polishchuck

DIAGNOSTICS OF VIRUS DISEASES OF FRUIT CROPS IN UKRAINE

It was conducted an identification of ACLSV, ASGV, ASPV, PPV, PDV, PNRV using ELISA. Distribution of these viruses and the percentage of infected plants in various sorts and grafts were investigated in different planting types. The primers pear was selected for diagnostic of ACLSV through PCR.