

ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ У ВИЯВЛЕННІ ВІРУСНИХ ХВОРОБ ЗА ВИПРОБУВАННЯ ТА РОЗМНОЖЕННЯ КЛОНІВ ВИНОГРАДУ

Н.А.Мулюкіна, кандидат біологічних наук

*Національний науковий центр "Інститут виноградарства і
виноробства ім. В.С. Таїрова"*

Імуноферментний аналіз застосовано в контролі санітарного стану клонодослідних ділянок, банку клонів, базових та сертифікованих маточників винограду. Проаналізовано рівні ураження клонів залежно від регіону виділення. Порівняно санітарний стан клонів на етапах клонодослідження та розмноження. Виноград, клонова селекція, санітарна селекція, банк клонів, базові та сертифіковані маточники, вірусні хвороби, імуноферментний аналіз.

Тестування на відсутність ураження вірусними хворобами є складовою частиною системи сертифікації садивного матеріалу винограду [1, 2]. Найчастіше для проведення тестування зараз застосовується метод імуноферментного аналізу (ІФА), який характеризується швидкістю проведення аналізу, чутливістю та специфічністю детекції [3, 4, 5]. Головною сферою застосування ІФА в процесі санітарної сертифікації винограду є тестування на відсутність латентного ураження вірусами коротковузля, скручування листя (перший і третій серотипи), мармуровості, а також вірусами А і В винограду [1, 4].

Метод використовується як складова санітарної селекції на клонодослідних ділянках [2, 6], де визначається санітарний статус клону. Надалі ІФА застосовується на етапах розмноження клонів, яке відбувається через послідовне закладання банку клонів, базових та сертифікованих маточників винограду, санітарний стан яких має бути ідентичним стану рослин клонодослідної ділянки.

В Україні ІФА використовували на зазначених вище етапах в системі санітарної сертифікації садивного матеріалу винограду. На банку клонів, базових та сертифікованих маточниках метод було застосовано вперше. Отримані при цьому дані потребують аналізу та узагальнення.

Метою роботи було застосування імуноферментного аналізу для визначення санітарного стану рослин клоновипробувальних ділянок, банку клонів, базових і сертифікованих маточників. Для її виконання слід було вирішити такі завдання:

- провести перевірку кущів клонів першого та другого вегетативних поколінь (П1 і П2), рослин банку клонів, базових і сертифікованих маточників;
- оцінити рівні ураження клонів вірусними хворобами залежно від регіону походження;
- порівняти санітарний стан клонів на етапах клонодослідження та розмноження.

Матеріал та методи.

Роботу проведено в лабораторії вірусології та мікробіології ННЦ “ІВіВ ім.В.Є. Таїрова” протягом 2000-2007 рр.

Первинний обсяг матеріалу був представлений понад 500 вихідними кущами — клонами прищепних і підщепних сортів, з яких в подальшому було відібрано і розмножено 230 клонів першого вегетативного покоління.

Дослідження було проведено за допомогою двох модифікацій ІФА — DAS та DASI-ELISA (“сендвіч”-метод та непрямий “сендвіч”-метод).

Для проведення досліджень використовували діагностичні набори фірми “AgriTest” (Італія).

Результати досліджень застосування ІФА в санітарній оцінці кущів клонів.

На клонодослідних ділянках на етапі першого і другого вегетативних поколінь (П1 і П2) санітарні заходи включали проведення двічі на рік візуальної санітарної селекції та повне проходження всіх видів польового і лабораторного тестування, насамперед за допомогою ІФА. На етапі випробування другого вегетативного покоління (П2) здійснювали повторне лабораторне тестування перспективних клонів та проводили ті діагностичні процедури, що з будь-яких причин не були задіяні за тестування першого вегетативного покоління.

Результати досліджень санітарного стану клонів першого та другого вегетативного поколінь було оцінено залежно від регіону, де були відібрані дані клони (табл.1).

Таблиця 1

**Тестування першого та другого вегетативних поколінь (P₁ і P₂) клонів
прищепних сортів методом ІФА на відсутність прихованого
ураження вірусною інфекцією (2000-2006 рр.)**

Групи клонів за місцем виділення	Загальна кількість перевіраних клонів	Приховане ураження вірусами (кількість уражених до загальної кількості перевіраних клонів)			
		Вірус коротко- вузля	Перший серотип ВСЛВ	Третій серотип ВСЛВ	Вірус мармуро- вості винограду
Одеська область	11	0/11	0/11	0/11	2/11
Херсонська область	4	0/4	0/4	0/4	0/4
АР Крим	2	0/2	1/2	0/2	1/2
Закарпатська область	3	0/3	1/3	0/3	0/3
Молдова (інтродуковані клони)	5	0/5	0/5	1/5	1/5

Примітка: Дані представлені вибірково. ВСЛВ – вірус скручування листя

Відбори в Одеській області було проведено на виноградниках ДГ “Таїровський” та ім.Суворова і “Шабо”; в Херсонській – радгоспу ім. Леніна та “Цурюпинський”; в Закарпатській області – радгоспів “Берегівський” і “Виноградівський”, АР Крим – ВАТ “Ізумрудний”. Слід зазначити, що відібрані вихідні кущі представляли собою різноманітний матеріал для санітарної селекції з огляду на специфічне епідеміологічне становище в цих регіонах.

Як видно з таблиці 1, санітарний стан перевіраних клонів відносно прихованого ураження вірусними хворобами є цілком задовільним. На візуально відібраному матеріалі практично відсутнім було ураження найбільш шкідливими хворобами – коротковузлям та скручуванням листя. Трохи більшим було ураження вірусом мармуровості, який викликає напівлатентну хворобу, що не впливає на зовнішні ознаки та агробіологічні показники рослин. Різниця у рівнях ураження даними хворобами пов'язана із можливістю візуального виявлення коротковузля та скручування на вихідних кущах, які відбираються, та неможливістю визначення

ураження мармуровістю на них через латентний перебіг захворювання.

Дані таблиці 1 є непрямим підтвердженням частішої зустрічаємості шкідливих вірусних хвороб в АР Крим, Закарпатській області та Молдові, де на окремих клонах було виявлено ураження вірусом скручування (переважно першим серотипом) і вірусом мармуровості винограду. Високі рівні ураження садивного матеріалу та маточних кущів винограду з регіонів Криму і Молдови отримані також спеціалістами лабораторії вірусології та мікробіології ЗАО “Коньячний завод” [7, 8].

Аналізуючи санітарний стан клонів, слід зазначити, що латентне ураження вірусною інфекцією не було виявлено на жодному з клонів столових сортів, в той час, як воно зустрічалось на окремих кущах клонів підщепних та технічних сортів винограду. Цей факт пов'язаний, ймовірно, з відносно недавнім походженням більшості столових сортів через генеративну селекцію, яка практично усуває вірусну інфекцію [4].

Порівняння санітарного стану рослин клонодослідної ділянки, банку клонів, базових та сертифікованих маточників.

Дані періодичного контролю санітарного стану кущів клонів прищепних сортів на клонодослідних ділянках, банку клонів, базових та сертифікованих маточниках вибірково надано в таблиці 2.

Як видно з таблиці, клони, відібрані як вільні від вірусів, на етапах клонодослідження, зберігають свій санітарний стан протягом тривалого часу на етапах розмноження. В той же час, якщо протягом клонодослідження на тому чи іншому клоні було виявлено окремі кущі, уражені вірусними хворобами листя, їх своєчасно можна було вилучити з розмноження. Тим самим було забезпечено добрий санітарний стан банку клонів, базових та сертифікованих маточників.

Очевидно, вивчення кількох вегетативних поколінь та закладання банку клонів створює сприятливі умови для етапності санітарної роботи і бар'єри на шляху ураження кінцевої продукції — сертифікованих саджанців винограду.

В найближчі роки наші дослідження будуть спрямовані на всебічну оцінку санітарного стану базових і сертифікованих

**Порівняння санітарного стану клонів прищепних сортів винограду
на етапах клонодослідження та розмноження (2000-2007 рр.)**

Сорт	Клон	Клонодослідні ділянки (перше та друге вегетативне покоління (2000-2006 рр.))		Банк клонів (2004-2007 рр.)		Базові та сертифіковані маточники (2005-2007 рр.), ВАТ «Придунайський» Одеської області	
		GFLV	GLRaV I, III	GFLV	GLRaV I, III	GFLV	GLRaV I, III
Каберне Совіньйон	1473	-	-	-	-	-	-
Каберне Совіньйон	441	-	-	-	-	-	-
Каберне Совіньйон	1076	+	-	Не закладали			
Піно чорний	532	-	-	-	-	-	-
Трам'єр рожевий	3360	-	-	-	-	-	-
Рислінг рейнський	14174	-	+	Не закладали			
			(перший серотип)				

Примітка: Дані представлені вибірково. GFLV – вірус коротковузля винограду, GLRaV I та GLRaV III – перший та третій серотипи вірусу скручування листя винограду відповідно; - негативний результат тестування (відсутність ураження вірусами), + - позитивний результат тестування (ураження вірусами).

маточників прищепних і підщепних сортів винограду в п'яти областях України шляхом імуноферментного аналізу та визначення заходів запобігання вторинного ураження насаджень.

ВИСНОВКИ

1. Санітарний стан клонів, встановлений за допомогою ІФА, свідчить про високу ефективність візуальних відборів у відношенні коротковузля та скручування листя винограду та нижчу у відношенні напівлатентних вірусних хвороб (зокрема, мармуровості винограду).
2. Аналіз ураження клонів вірусною інфекцією залежно від регіону відбору свідчить про більшу частоту зустрічаємості

- вірусних хвороб в АР Крим, Закарпатській області та Молдові, і нижчу — в Одеській та Херсонській областях.
3. Порівняння санітарного стану перспективних клонів на етапах клонодослідження та розмноження (банк клонів, базові та сертифіковані маточники) демонструє тривалість збереження санітарного стану “вільні від вірусних хвороб” у відношенні вірусів коротковузля і скручування листя.

ЛІТЕРАТУРА

1. EPPO Standards. Certification schemes. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks // European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France. – 2003. – РМ 4/1-26 English. – p.1-13.
2. Власов В.В., Тулаева М.И., Мулюкина Н.А. Система производства сертифицированного посадочного материала винограда в Украине // Питомниководство винограда в Украине. Тем. сборник материалов секции виноградарства Отделения растениеводства Росс. Акад. с./х. наук. – Краснодар, 2004. – С.34-43.
3. Boscia D., Digiario M., Fresno J., Greif C., Grenan S., Kassemeyer H.H., Prota V.A., De Sequeira O.A. ELISA for the detection and identification of grapevine viruses // In: Walter B. (Ed.). Sanitary selection of the grapevine // Colmar (France), Ed. INRA, Paris – 1997. – Les Colloques, No 86.
4. Walter B. (Ed.). Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases // INRA Editions, Paris. – 1997.
5. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // Journal of General Virology. – 1977. – 34. – p. 475 – 483.
6. Технологія виробництва безвірусного посадочного матеріала плодоягідних культур и винограда. – М.: Союзплодопитомник, 1989. – 168 с.
7. Мілкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько І.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя // Мікробіол. журн.- 2005. – Т. 67. – № 1. – С.41-47
8. Жунько І.Д. Віруси – збудники захворювань винограду на півдні України (діагностика і поширення) // Автореф. дис. канд. біол. наук. – Київ, 2006. – 22 с.