УДК 635.21:632.38:58.083

© 2009

А. А. Бондарчук, Т. М. Олійник, кандидати сільськогосподарських наук

С. О. Слободян, Р. В. Грицай

Н. А. Захарчук, кандидат біологічних наук

Інститут картоплярства УААН

СУЧАСНІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ФІТОПАТОГЕНІВ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В НАСІННИЦТВІ КАРТОПЛІ

Висвітлюються сучасні методи діагностики для основних патогенів картоплі з метою отримання оздоровленого насіннєвого матеріалу: бактеріальні – кільцева гниль картоплі (Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus), бура бактеріальна гниль (Ralstonia solanacearum); вірусні - L-вірус скручування листків картоплі (Potato Leafroll Virus), M і S карлавіруси картоплі (Potato Virus M, Potato Virus S), X вірус і аукуба мозаїки потексвіруси картоплі (Potato Virus X, Potato Aukuba Mosaic Virus), Y і A потівіруси картоплі (Potato Virus Y, Potato, Virus A), андійський латентний тімовірус картоплі (Andean Potato Latent Virus), а також віроїд веретеноподібності бульб картоплі (Potato Spindle Tuber Viroid); бліда (Globodera pallida) і золотиста (Globodera rostochiensis) цистоутворюючі картопляні нематоди та фітофтора картоплі (Phytophthora infenstans).

Ключові слова: *картопля, імуноферментний аналіз, віроїд веретеноподібності бульб картоплі, віруси, молекулярно-гібридизаційний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, метод полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією,оздоровлена картопля, насінництво.*

Картопля (Solanum tuberosum L.) в усьому світі є цінною сільськогосподарською культурою. В Україні її вирощують на площі близько 1,5 млн. га, проте урожайність лишається низькою.

Однією з передумов високої продуктивності картоплі є використання якісного, вільного від фітопатогенів різної природи оздоровленого насіннєвого матеріалу. Останнім часом особливу увагу привертає віроїд веретеноподібності бульб картоплі (ВВБК) та патогени вірусного походж-

ження, які найважче виявити через складнощі, що пов'язані із внутрішньоклітинним паразитизмом та латентною формою ураження.

На даний час у насінництві картоплі існують такі методи визначення вірусної інфекції: візуальний, серологічний (крапельна серодіагностика, імуноферментний аналіз), індикаторний та індексації вічок бульб. Серед перерахованих методів діагностики вірусної інфекції найбільшого поширення набув метод імуноферментного аналізу.

Імуноферментний аналіз (ІФА) може виявити патоген у малих концентраціях (до 1 нг/мл) як в рослинах, так і в посівному матеріалі на ранніх стадіях інфекції. Це дає змогу діагностувати одночасно широкий спектр штамів вірусів різної морфології, вивчати структуру та філогенію різних таксономічних груп фітовірусів та встановити серологічну спорідненість виділених ізолятів. За допомогою цього методу можливе проведення своєчасного вибракування хворого та добір здорового насіннєвого матеріалу. Метод ІФА заснований на використанні антигенів та антитіл, мічених ферментами. Антитіло виступає в якості специфічного детектора, а фермент в якості маркера імуноферментної реакції, за допомогою якого візуалізується утворення комплексів. По забарвленню субстрату говорять про кількість компонентів реакції антиген-антитіло, які вступають у взаємодію.

При діагностиці вірусної інфекції методом ІФА існує два незалежних методи: ідентифікація антигену і виявлення антитіл.

Перший полягає в ідентифікації вірусного антигену в пробах, а другий – у виявленні антитіл до вірусних антигенів. Детекція антигену дає змогу виявити вірусоносійство, в той час як детекція антитіл виявляє реакцію імунної системи організму рослини при контакті з вірусом і не дає можливості точно встановити специфічність вірусної інфекції [1].

Для ідентифікації вірусних антигенів як правило використовують схему "подвійного антитільного сендвіча". Вперше застосування "подвійного антитільного сендвіча" з використанням поліклональної сироватки для виявлення HBs-антигена було описано в 1976 – 1977рр.

При виявленні антитіл до вірусних антигенів традиційною є схема "не прямого сендвіча". Як і в попередньому варіанті, однією з основних проблем є отримання високочутливих вірусних антигенів. При використанні інактивованого вірусу і очистці вірусного матеріалу в цукровому градієнті вдалось отримати достатньо чистий вірусний матеріал який можна використовувати у створенні ІФА тест-систем, що мають достатню чутливість і специфічність [2].

Проте на сучасному етапі розвитку біотехнології даний метод має цілий ряд недоліків, пов'язаних головним чином з його невисокою чутливістю до виявлення латентної вірусної інфекції, до того ж він не завжди дає змогу виявити один з найбільш небезпечних фітопатогенів у системі насінництва - віроїд веретеноподібності бульб картоплі (ВВБК).

Віроїд веретеноподібності бульб картоплі створює серйозну небезпеку для її насінництва. Враховуючи високі вимоги, які ставляться до рослин in vitro як стартового матеріалу в різних системах оригінального насінництва постає необхідність у використанні методів, з максимальною чутливістю і специфічністю [6]. Цим вимогам відповідають методи, що базуються на молекулярній детекції генетичного матеріалу патогена, за допомогою сучасних технологій молекулярної біології.

Для діагностики рослинного матеріалу на вірусоносійство і ВВБК різними лабораторіями застосовуються такі методи як молекулярно-гібридизаційний аналіз (МГА), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), метод зворотної транскрипції полімеразно-ланцюгової реакції (ЗТ–ПЛР) з подальшим проведенням електрофорезу продуктів реакції в поліакриламідному (ПААГ) чи агарозному гелях, або флуориметрична детекція амплікону у полімеразно ланцюговій реакції в реальному часі (ПЛР–РЧ).

Молекулярно-гібридизаційний аналіз (МГА). Молекулярна гібридизація нуклеїнових кислот заснована на принципі формування дуплекса (гібридизації) між «сигнальною» нуклеїновою кислотою (пробою) і нуклеїновою кислотою патогена (вірусу, віроїду) - "мішенню ". Молекула проби несе мітку, яка може бути радіоактивною або нерадіоактивною. Типовий протокол аналізу на основі молекулярної гібридизації складається з наступних етапів: пробопідготовка і нанесення на нітроцелюлозну мембрану; іммобілізація зразків і перегібридизація; гібридизація з пробою; видалення незв'язаної проби промиванням; детекція зв'язаної проби радіоавтографічним чи хемілюмінесцентним способами. Відповідно до розробленого протоколу діагностики віроїдів [12] зразок, що містить сумарний препарат нуклеїнових кислот, наноситься на мембранний фільтр і фіксується на ньому. Фільтри розміщують у гібридизаційний розчин в якому знаходиться ДНК-зонд мічений (дієн)Pt. ДНК-зонд гібридизується (зв'язується) тільки зі зразками зараженими віроїдом, що діагностується. Специфічний гібридний дуплекс виявляється на основі імуноферментного аналізу, для чого зразки із зв'язаним ДНК-зондом розміщують у блокуючий розчин, а потім у розчин, що містить первинні моноспецифічні антитіла до (дієн)Pt-ДНК. При цьому антитіла зв'язуються тільки із зраз-

ками, що зв'язали ДНК-зонд. Далі, після промивання і блокування, зразки інкубують з кон'югатом вторинних антитіл з лужною фосфатазою, які зв'язуються з первинними антитілами. Система проявлення складається із буфера, субстрату для фосфатази і барвника. У результаті ферментативної реакції утворюється нерозчинний продукт-барвник, що фарбує зразки, які зв'язали кон'югат вторинних антитіл і, відповідно, уражені віроїдом. Таким чином, у результаті діагностичних аналізів візуально можна визначити ураженість віроїдом, при чому інтенсивність забарвлення відповідає ступеню зараження.

Чутливість детекції патогенів методом молекулярної гібридизації залежить від низки умов. Сюди відносяться такі фактори, як локалізація проби на молекулі- мішені, якість мембранного фільтру, що використовується для аналізу, якість і тип приготовленого препарату нуклеїнових кислот. Багато залежить від розміру зонда, при чому, чим він більший, тим більша чутливість може бути досягнута і різниця іноді може бути в 200 разів [3].

Полімеразна ланцюгова реакція. В 1985 р. Кері Б. Мюлліс [13] запропонував метод ампліфікації (amplification – збільшення, посилення) раніше відібраної частини ДНК в пробірці, що по суті є методом клонування in vitro. Метод отримав назву полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, від англійського Polymerase Chain Reaction, PCR). В основі даного методу лежить комплементарна добудова ДНК матриці, що здійснюється *in vitro* за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Ця реакція має назву реплікації ДНК. Вона включає в себе декілька стадій:

- денатурація ДНК (розплетення подвійної спіралі, розходження ниток ДНК);
- утворення коротких дволанцюгових ділянок ДНК олігонуклеотид (затравок, необхідних для ініціації синтезу ДНК (відпалювання праймерів);
- синтез нових ланцюгів ДНК (комплементарна добудова двох ниток).

У разі багатократного повторення циклів синтезу відбувається збільшення числа копій специфічного фрагменту ДНК. Це дає змогу із невеликої кількості матеріалу, що аналізується та містить одиничні молекули нуклеїнових кислот, отримувати достатню кількість ДНК-копій для ідентифікації їх методом електрофорезу. Іншими словами, метод ПЛР являє собою багатократне збільшення числа копій (ампліфікація) специфічної частини дволанцюгової ДНК, обмеженої праймерами, що каталізуються ферментом ДНК-залежною ДНК-полімеразою.

Кожен цикл ампліфікації включає три етапи, що протікають в різних температурних режимах:

Перший етап. Денатурація ДНК (розплетення подвійної спіралі). Протікає при 93-950 С протягом 30-60 секунд.

Другий етап. Приєднання праймерів (відпалювання). Приєднання праймерів відбувається комплементарно до відповідних послідовностей на протилежних ланцюгах ДНК на границях специфічної ділянки. Для кожної пари праймерів існує своя температура відпалювання, значення якої лежить в інтервалі 45-65 0 С, 5-60 секунд.

Третій етап. Добудова ланцюгів ДНК. Комплементарна добудова ланцюгів ДНК проходить від 5-кінця до 3-кінця ланцюга в протилежних напрямках, починаючи з ділянок приєднання праймерів. Матеріалом для синтезу нових ланцюгів ДНК служать добавлені в розчин дезоксирибонуклеотидтрифосфати (дНТФ). Процес синтезу каталізується ферментом термостабільною ДНК-полімеразою (Taq-полімеразою) і відбувається при температурі 70-72 ^{0} С. Процес полімеризації ДНК потребує наявності іонів магнію в реакційному середовищі. Час проходження синтезу – 20-60 секунд. При оптимальних умовах Taq-полімераза каталізує вбудовування монодезоксирибонуклеотидів у синтезований ланцюг ДНК зі швидкістю 1500 нуклеотидів/хвилину. Утворені в першому циклі ампліфікації нові ланцюги ДНК служать матрицями для другого циклу ампліфікації, в якому відбувається утворення специфічного фрагменту ДНК (амплікона). У подальших циклах ампліфікації амплікони служать матрицею для синтезу нових ланцюгів. Таким чином, відбувається накопичення ампліконів у розчині за формулою:

$N= a2^n$,

де, N – число ампліконів;

а – початкове число матриць;

n – число циклів ампліфікації.

Отже, якщо у вихідному розчині спочатку знаходилась лише одна дволанцюгова молекула ДНК, то за 30-40 циклів у розчині накопичується близько 10^8 молекул ампліконів.

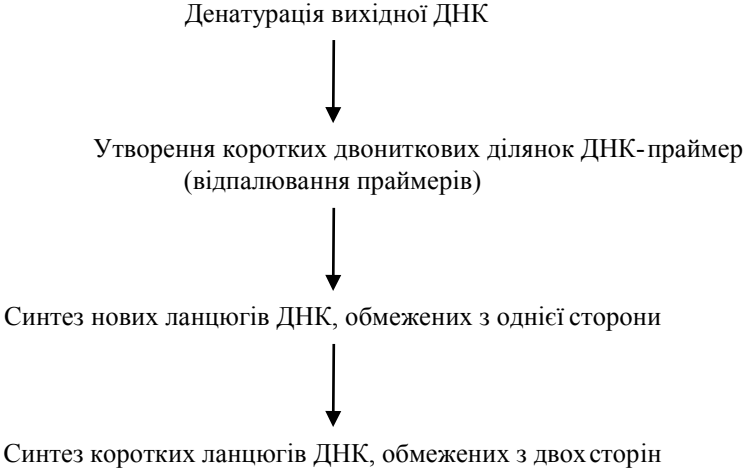
Важливо відмітити, що уже після першого циклу ПЛР накопичення ампліконів в реакційній суміші відбувається в геометричній прогресії згідно вищевказаної формули, в той час як накопичення фрагментів ДНК, що синтезуються з вихідної матриці, проходить тільки в арифметичній прогресії.

Синтезований в ході реакції продукт можна аналізувати різними методами. Одним із простих і ефективних методів є електрофоретичне

розділення ампліконів в агарозному чи поліакриламідному гелях з детекцією ДНК за допомогою інтеркалярних барвників, таких як бромистий етидій [4].

Досить важливим етапом ПЛР-аналізу є адекватний підбір праймерів і оптимізація умов проведення реакції [3].

Схема ПЛР:



Зворотна транскрипція-Полімеразна ланцюгова реакція - ЗТ–ПЛР. Були розроблені швидкі і високочутливі методи RT–PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – Зворотна транскрипція–Полімеразна ланцюгова реакція – ЗТ–ПЛР) для детекції РНК-вмісних вірусів [14] і віроїдів [15].

У базовому процесі ПЛР використовується термостабільна ДНК полімераза. Таким чином, можливості методики обмежуються аналізом зразків ДНК. При застосуванні методики ПЛР для аналізу РНК даний зразок повинен бути спочатку зворотно транскриптований в кДНК для створення ДНК матриці, необхідної для термостабільної ДНК полімерази. Тому, для створення ДНК копій на РНК матриці головним чином використовують зворотні транскриптази *Avine myeloblast virus (AMV)* та *Moloney murine Leukemia virus* (M-MLV, MuLV). Використовується також випадковий оліго dT праймер або праймери специфічні до послідовності.

Альтернативно деякі ДНК-полімерази (Tfh ДНК полімераза) суміщають РНК полімеразну дію яка може бути активована в певних умовах (використання катіонів марганцю замість магнію). Після цього початкового кроку зворотної транскрипції йдуть кроки основної ПЛР, ампліфікуючи цільову послідовність як молекулу ДНК.

Якість і чистота стартової РНК є критичною для успішної ЗТ-ПЛР. Загальна і полі-А РНК можуть бути використані як матриця, але обидві повинні бути інтактними і вільними від забруднення геномною ДНК. Специфічне зв'язування полі-А РНК буде збагачувати цільові повідомлення, тому менше реакцій зворотної транскрипції потрібно для подальшої ампліфікації. Ефективність реакції синтезу першого ланцюга, який пов'язаний з якістю РНК матриці, буде також значно впливати на результати подальшої ампліфікації [11].

Детальні протоколи для ЗТ–ПЛР-детекції ВВБК з дуже високою чутливістю в різних тканинах картоплі: бульб, флоемі, ксилемі, справжньому насінні, пилкових зернах і т. д. описані [16].

Типовий протокол ЗТ–ПЛР складається із наступних етапів: 1) визначення послідовності і синтез праймерів; 2) підготовка суміші для зворотньої транскрипції (буфер, 4 дезоксинуклеотидтрифосфати, зворотній праймер, фермент зворотньої транскрипції, інгібітор рибонуклеаз); 3) синтез кДНК; 4) підготовка суміші для реакції ПЛР (буфер для ПЛР, 4 дезоксинуклеотидтрифосфати, $MgCl_2$, два праймери і ДНК-полімераза); 5) ампліфікація; 6) виявлення проёдукту ПЛР відомими методами [3].

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (ПЛР–РЧ). Одним із найсучасніших молекулярно-генетичних методів діагностики патогенів, зокрема і віроїда веретеноподібності бульб картоплі, є метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР–РЧ). Даний метод базується на класичному методі зворотньої транскрипції полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ–ПЛР), який проходить у два основних етапи. Початково, за допомогою ферменту зворотньої транскриптази, на матриці РНК віроїду синтезують комплементарну ДНК, після чого проходять цикли полімеразної ланцюгової реакції, у ході якої (при наявності патогенну) другий фермент (Taq-полімераза) здійснює добудову нуклеотидного ланцюга.

У ПЛР–РЧ ДНК-зонд має спеціальну флуоресцентну мітку, що містить погашувач флуоресценції, який поглинає флуоресценцію при надходженні мітки в реакційну суміш. При наявності патогену зонд

приєднується до комплементарної ділянки ланцюга ДНК, погашувач відходить від мітки, внаслідок чого флуоресценція посилюється.

Аналіз проходить в ампліфікаторі (скомпонованому з оптичним модулем), який уловлює флуоресценцію і автоматично реєструє продукт ПЛР під час ампліфікації, тобто в реальному часі.

Переваги методу ПЛР–РЧ по відношенню до стандартного ПЛР, полягають у тому, що реакція відбувається в одній пробірці і не потребує проведення ні електрофорезу, ні забарвлення бромистим етидієм, тим паче, що він досить токсичний.

Відповідно до літературних даних, метод ПЛР–РЧ є більш ефективним порівняно із зворотною транскрипцією і молекулярною гібридизацією [10]. Крім того, метод зручний для масової діагностики. Згідно думки Бунхама і співавторів [8], за його допомогою можна виявити всі варіанти патогенів, ідентифіковані на даний час.

Звичайно, ці методи по чутливості і точності результатів набагато переважають методи рослин-індикаторів чи імуноферментного аналізу, проте мають і деякі недоліки. Згідно з літературними даними є випадки суперечливих результатів діагностичних даних на наявність ВВБК, що проводилися різними методами. За даними [12] метод ПЛР в 20 – 50 раз чутливіший за МГА з дієн-платиновою міткою. Тому легко пояснити ситуацію, коли МГА дає оцінку “ - “ , а ПЛР “ +”. Але серед літературних джерел є дані, коли менш чутливий метод давав позитивну оцінку, а більш чутливий – негативну. Автор пояснює це недостатньою якістю препаратів нуклеїнових кислот, які виступають як інгібітори реакції ЗТ – ПЛР [11].

На превеликий жаль сучасні методи діагностики рослинного матеріалу не завжди спроможні виявити вірус чи віроїд. З огляду літературних джерел відомо, що дані патогени знаходяться в рослинах незалежно від того яким способом вони були оздоровлені і навіть ті рослини, які вважалися оздоровлені, через певний проміжок часу показують їх наявність.

Так, свій безвіроїдний статус втратили деякі меристемні лінії сортів, що широко використовувалися в оригінальному насінництві картоплі Російської Федерації [6]. Під час тривалого періоду культивування цих сортів проводилась діагностика на наявність віроїду різними методами і всі вони показували його відсутність. Однак, несподівано лінії, які знаходились в колекції близько 5 – 6 років і продіагностовані методом МГА показали наявність віроїду, при чому від моменту першої перевірки до повторного аналізу не пройшло і двох місяців. Через півроку це було підтверджено методом ПЛР.

На основі вищенаведеного була подана гіпотеза: віроїд асоційований з рослиною-господарем в такій формі, що до деякого моменту патоген не може діагностуватися ні одним з методів (які б вони не були чутливі), але несподівано він "прокидається " і рослина *in vitro* стає ураженою [6]. Тобто, патогени в рослині знаходяться в дуже низькій концентрації, тому не виявляються, проте коли настають сприятливі або провокуючі умови його концентрація різко зростає і тоді таку рослину вже не можна вважати оздоровленою.

Широкомасштабна робота по діагностиці вірусів і ВВБК різними методами протягом 15 років дала змогу виявити як позитивні сторони, так і недоліки кожного з них, а головне, підтвердила придатність для максимальної гарантії "безвірусного" і "безвіроїдного" статусу зразків банку здорових сортів [5].

Основними критеріями оцінки методів діагностики є: а) чутливість; б) достовірність результатів; в) вартість; г) можливість автоматизації; д) безпечність; е) тривалість аналізу; є) можливість масової діагностики.

Серед методів діагностики фітопатогенів останнім часом все більшу роль відіграє метод ПЛР, який вже досить поширений завдяки своїй простоті й чутливості [9].

Для діагностики бактеріальних і фунгальних інфекцій картоплі за допомогою методів молекулярної біології, попередньо проводять пошук видоспецифічних і водночас відносно консервативних ділянок ДНК патогену, за якими можлива ідентифікація цих організмів. Історично першим підходом, що зараз практично втратив свою актуальність, є пошук груп специфічнихпослідовностей ДНКзадопомогою RAPD-аналізу. Проводячи ПЛР-реакцію з праймерами завдовжки 10 або 12 нуклеотидів ДНК цільового організму і групи інших бактерій отримують ряд спектрів продуктів ампліфікації. Серед них вибирають унікальні для об'єкту дослідження амплікони, ізолюють і секвенують їх, після чого до вже відомої послідовності підбирають праймери (діагностичні).

Стрімке накопичення інформації про первинну структуру геному, для все більшої кількості організмів, відкритий доступ до якої є можливим за допомогою електронних баз даних (GenBank) значно полегшили роботу з підбору груп специфічних праймерів. Використання спеціального програмного забезпечення відчутно розширює можливості і спрощує роль дослідника в пошуку цільової ділянки ДНК. Однак, у зв'язку із значним розміром бактеріального геному, порівняно із геномом вірусів, це завдання ускладнюється існуванням значно більшої кількості можливих варіантів,

які здаються рівноцінними. При виборі остаточного з них користуються низкою додаткових критеріїв.

Чутливість молекулярного аналізу визначається, зокрема, ефективністю зв'язування праймера з ДНК-матрицею. На практиці різні пари праймерів до одного гену можуть відрізнятися в чутливості на три порядки. Ефективність ампліфікації є обернено пропорційною до довжини амплікону. Відносно короткі ділянки ДНК не тільки краще ампліфікуються, а й легше піддаються кількісному визначенню в ПЛР-РЧ. Окрім того, геномні ділянки меншого розміру мають більше шансів залишитися інтактними в умовах помірної деградації ДНК, що робить детекцію менш вибагливою до умов виділення нуклеїнових кислот.

Для бактерій існує декілька типових категорій цільових ділянок ДНК, що використовуються в молекулярній ідентифікації. Серед усіх використовуваних на даний час методик детекції, більше половини базуються на аналізі регіону рРНК генів. Його поширеність пояснюється вмістом як висококонсервативних послідовностей, так і помірно варіабельних сегментів. Більш того послідовності рРНК генів зараз розшифровані для практично всіх мікроорганізмів господарського значення. Найчастіше для ідентифікації бактерій використовується 16S рРНК ділянка, 23S рРНК послідовність знайшла менше застосування. 16S-23S спейсерний регіон характеризується високою міжвидовою варіабельністю, довжина якого варіюєвід 60 до 1529 пароснов. Достовірністьідентифікаціїмікроорганізму на основі аналізу рРНК генів стає майже абсолютною при секвенуванні ампліфікованої ділянки, в якості другого етапу аналізу, що стає все більш доступним методом [19].

Білкові гени використовують у молекулярній діагностиці звичайно з метою генетичного відображення фенотипових систем класифікації (поділу на серо- хемогрупи, біотипи, тощо). Такі тест-системи звичайно розробляються тільки для певного виду або невеликої групи бактерій. Типовими групами таких генів є гени токсинів, поверхневих епітопів, метаболітичних ферментів, факторів вірулентності. Праймери можуть бути підібрані також до нуклеотидної послідовності, що відповідає певному унікальному для мікроорганізму білка. Наприклад фазеолотоксину Pseudomonas syringae, ендоцелюлази Clavibacter michiganensis, поверхневому антигену (PehB) Ralstonia solanacearum [17]. Одним із недоліків використання білкових генів як маркерів у діагностиці є те, що вони представлені у вигляді однієї копії в клітині. Це обумовлює нижчу чутливість і надійність такого аналізу, порівняно з ПЛР мультикопійних генів, таких як 16S рРНК [18].

Повторювані послідовності або IS-елементи, що набули широкого застосування в паспортизації сортів рослин і характеризуються високою інформативністю, можуть бути використані також в ідентифікації окремих видів мікроорганізмів.

Велика робота була присвячена описанню і розробці ПЛР-тест-систем для основних патогенів картоплі: бактеріальні – кільцева гниль картоплі (*Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus*), бура бактеріальна гниль (*Ralstonia solanacearum*); вірусні: L-вірус скручування листків картоплі *(Potato Leafroll Virus*), M і S карлавіруси картоплі (*Potato Virus M, Potato Virus S)*, X вірус і аукуба мозаїки потексвіруси картоплі *(Potato Virus X, Potato Aukuba Mosaic Virus)*, Y і A потівіруси картоплі *(Potato Virus Y, Potato, Virus A)*, андійський латентний тімовірус картоплі *(Andean Potato Latent Virus)*, а також віроїд веретеноподібності бульб картоплі *(Potato Spindle Tuber Viroid)*, бліда *(Globodera pallida)* і золотиста *(Globodera rostochiensis)* цистоутворюючі картопляні нематоди та фітофтора картоплі *(Phytophthora infenstans)* [7].

ПЛР-аналіз дає змогу проводити широкомасштабне вивчення сотень і тисяч зразків за короткий проміжок часу. При цьому немає необхідності мати велику кількість матеріалу і не потрібні складні методи виділення ДНК. Сама реакція автоматизована і проводиться під контролем ампліфікатора. Цей метод – важливий інструмент у плануванні селекції на комплексну чи відповідну стійкість проти біотичних і абіотичних факторів.

Висновки. Використання сучасних високочутливих лабораторних методів діагностики різного роду патогенів є обов'язковим етапом технології виробництва насіннєвої картоплі.

Для формування оздоровленого матеріалу картоплі у насінництві необхідно застосовувати комплекс біологічних, біохімічних і молекулярних методів детекції патогенів.

Бібліографічний список

1. Венгеров Ю. Ю. Современные методы иммуноферментного анализа для диагностики вирусных инфекций. / Ю. Ю. Венгеров, Т. В. Буларгина, А. А. Кущ, С. М. Воробйов, Е. С. Северин // Біотехнологія. - 1987. – Т. 3. – С. 291-295.

2. Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля. – Л.: Колос, 1976. – С. 13-16.

3. Методические указания по диагностике вироида веретеновидности клубней картофеля при формировании и поддержании банка здоровых

сортов. – Российская академия сельскохозяйственных наук. Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха. – М., 2003. – С. 9-12.

4. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции. – Российская академия сельскохозяйственных наук. Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха. – М., 2003. – С. 15-18.

5. Мусин С. М. Биологическая, биохимическая и молекулярная диагностика вироидного заболевания при формировании банка здоровых сортов картофеля Российской Федерации. – / Мусин С. М. Бойко В. В., Бабоша А. В., Петухов С. Н., Дементьева З. А., Бирюкова В. А., Шмыгля И. В., Хромова Л. М., Кондакова О. А., Дрыгин Ю. Ф., Атабеков И. Г., Аригава Н. В., Завриев С. К. Материалы международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Института картофелеводства Национальной академии наук Беларуси. Научные труды. Часть I, - Минск, 2003. – С. 300-310.

6. Мусин С. М. Некоторые проблемы диагностики ВВКК и поддержания безвироидного статуса образцов банка здоровых сортов картофеля in vitro. / Мусин С. М., Бойко В. В., Бойко Ю. П., Пєтухов С. Н., Шмыгля И. В., Дементьєва З.А. – Вопросы картофелеводства. Научные труды. – М., 2005. – С. 88-97.

7. Рязанцев Д. Ю. ПЦР – диагностика основных патогенов картофеля / Рязанцев Д. Ю., Абрамов Д., Завриев С. К. – Вопросы картофелеводства. Актуальные проблемы науки и практики. Научные труды. – М., 2006. – С. 242-248.

8. Boonham N., Gonzalez Perez L., Mendez M. S., Lilia Peralta E., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R. A. Development of a real time RT–PCR assay for the detection Potato spindle tuber viroid. //Journal of Virological Methods . – 2004. – Vol. 116. – P. 139-146.

9. Detection and quantification of fungal and bacterial potato pathogens in plants and soil / Cullen D. W.; Lees A. K.; Toth I. K.; Bell K. S.; Duncan J. M. // Bull. OEPP., - Oxford. – 2000; - v. 30. – N. ¾. – P. 485-488.

10. Roenhorst J. W., Jansen C. C. C., Kox L. F. F., de Haan E. G., van den Bovenkamp G. W., Boonham N., Fisher T., Mumford R. A. Application of real time RT–PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber viroid // In: Proceedings of the 12th EAPR Virology Section Meeting. Rennes – France 2004, June 13th – 19th, 67.

11. Источник для открытия. Путеводитель по методикам и способам применения // третье издание – Promega –1996 – ISBN 1-882274-57-1 – 404 С. – Се. 193-206 (выборочный перевод).

12. Кондакова О. А. Диагностика вироидного заболевания картофеля зондами (диен)Pt-ДНК. / О. А. Кондакова, Ю. Ф. Дрыгин // Біотехнологія. – 1999. – т. 4, С. 83-90.

13. Kary Mullis The Polymerase Chain Reaction, Nobel Lecture, December 8, LEX PRIX NOBEL. The Nobel Prizes. Almqvist and Wiksell Int.: 1993., Stockholm, Sweden.

14. Henson, J. M. and French, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis // Annual Review Phytopathology. – 1993. – Vol. 31. –P. 81-109.

15. Hadidi A., Yang X., Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification // Journal of Virological Methods. – 1990. – Vol. 30. – P. 261-270.

16. Shamloul A. M, Hadidi A, Zhu S. F, Singh R. P, Sagredo B, Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants // Canadian Journal of Plant Pathology. 1997. – Vol. 19. – P. 89-96.

17. Norman W. Schaad and Reid D. Frederick Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics // Can. J. Plant Pathol. – 2002. – Vol. 24. – P. 250–258.

18. Pastrick K.H., and Maiss E.. Detection of Ralstonia solanacearum in potato tubers by polymerase chain reaction // J. Phytopathol. – 2000. – Vol. 148. – P. 619–626.

19. Janda J. Michael and Abbott Sharon L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // Journal of clinical microbiology. – 2007. – Vol. 45. – P. 2761–2764.