



# Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 57.084:632.61

© 2015

*Л.А. Пилипенко,  
доктор біологічних наук*

*А.В. Карелов*

*Н.О. Козуб,  
кандидат біологічних наук*

*І.О. Созінов  
Інститут захисту  
рослин НААН*

*О.Р. Ваврух  
ДУ «Тернопільська обласна  
фітосанітарна лабораторія»  
Державної ветеринарної  
та фітосанітарної  
служби України*

*Г.В. Зеля*

*А.Г. Зеля,  
кандидат біологічних наук  
Українська науково-дослідна  
станція карантину рослин  
Інституту захисту  
рослин НААН*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА КАРТОПЛЯНИХ ЦИСТОУТВОРЮВАЛЬНИХ НЕМАТОД, ПОШИРЕНИХ У ЗОНАХ ПОЛІССЯ, ЛІСОСТЕПУ ТА В УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТАХ**

**Мета.** Визначити видовий склад карантинних організмів — картопляних цистоутворювальних нематод, поширених у зонах Полісся, Лісостепу та в Українських Карпатах. **Методи.** Польовий (маршрутні обстеження), лабораторні (екстракція нематод з ґрунтових проб; ідентифікація нематод за використання мультіплексної полімеразно-ланцюгової реакції зі специфічними праймерами, комплементарними рибосомному гену 18S та внутрішньому транскрибованому спейсеру ITS1). **Результати.** За використання мультіплексної полімеразно-ланцюгової реакції зі специфічними праймерами встановлено поширення *Globodera rostochiensis* у межах Тернопільської (загальна площа заражених угідь — 375,02 га), Закарпатської (16,75 га) Чернівецької (0,61 га) областей України. Розташування карантинних вогнищ у переважній більшості припадає на присадибні ділянки населення. **Висновки.** Засвідчено доцільність подальшої валідації методу за використання ширшої панелі зразків цистоутворювальних нематод із різних регіонів України. Одержані результати покладено в основу рекомендацій щодо здійснення фітосанітарного контролю в межах заражених територій для ефективної локалізації та ліквідації виявлених карантинних вогнищ.

**Ключові слова:** картопляні цистоутворювальні нематоди, молекулярна діагностика, мультіплексна полімеразно-ланцюгова реакція, поширення нематод.

Діагностування нематод за морфологічними та морфометричними ознаками є досить трудомістким процесом через мікроскопічні розміри цих організмів та морфологічну подібність споріднених видів. Тому в карантинних лабораторіях світу під час проведення

фітогельмінтологічного аналізу дедалі більше використовують методи молекулярно-генетичної діагностики [13]. Це дає змогу збільшувати діагностичну спроможність карантинних лабораторій та вчасно ухвалювати рішення щодо запровадження відповідних

заходів фітосанітарного контролю [3].

На початковому етапі впровадження молекулярно-генетичних методів у нематологічну практику загальноновживаним було виділення геномної ДНК нематод, обробка її рестриктазами та гібридизація з певними зондами. Унаслідок цього отримували відмінні профілі рестрикційних фрагментів, за якими й здійснювали діагностику. Цей метод потребував значної кількості ДНК матеріалу, тривалого часу на його проведення, використання радіоактивної мітки, а також характеризувався низькою специфічністю і базувався на невисокому поліморфізмі генетичного матеріалу [2]. Пізніше під час проведення фітогельмінтологічного аналізу в карантинних лабораторіях світу широко стали застосовувати такі різновиди полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), як «класична» ПЛР з використанням видоспецифічних праймерів (*B. xylophilus* [5], *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida* [4], *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne fallax*, *Meloidogyne enterlobii* [14], *Nacobbus aberrans* [1], *Ditylenchus dipsaci* [12]; *Ditylenchus destructor* [8], *B. xylophilus* [10], *H. glycines*, *H. avenae* [11]).

**Мета досліджень** — визначити видовий склад картопляних цистоутворювальних нематод, поширених у зонах Полісся, Лісостепу та в Українських Карпатах за використання мультіплексної ПЛР зі специфічними праймерами, комплементарними рибосомному гену 18S та внутрішньому транскрибованому спейсеру ITS1.

**Матеріали і методи досліджень.** Було використано зразки ґрунту, відібрані під час маршрутних обстежень сільськогосподарських угідь і присадибних ділянок на території 3-х областей: Тернопільської (Тернопільський, Бережанський, Збаразький, Буцацький, Зборівський та Підгаєцький райони), Чернівецької (Путильський) та Закарпатської (Міжгірський, Рахівський, Великоберезнянський райони).

Для подальшого аналізу цисти нематод виділяли з ґрунту з використанням удосконаленого методу Фенуїка [6]. Екстракцію ДНК проводили з 10–25 цист за використання набору реагентів Diatom™ DNA Prep100 (NeoGene) відповідно до розробленого компанією-виробником протоколу.

Мультіплексну ПЛР здійснювали за використання реагентів GenPak® PCR Core (NeoGene) та праймерів, комплементарних рибосомному гену 18S та внутрішньому

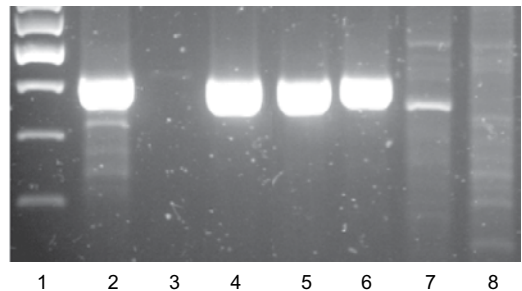
транскрибованому спейсеру ITS1: прямого універсального праймера 18S — UNI [7] та зворотних видоспецифічних праймерів PITSp4 (*G. pallida*) і PITSr3 (*G. rostochiensis*) [4].

Загальний об'єм реакційної суміші становив 10 мкл; ПЛР реакцію здійснювали на ампліфікаторі 2720 GeneAMP System за таким протоколом: початкова денатурація (94°C), 3 хв; 35 циклів ампліфікації: денатурація — 94°C, 30 с; відпал праймерів — 55°C, 30 с; подовження — 72°C, 30 с; кінцеве подовження — 72°C, 5 хв; утримання — 4°C.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі в 1X TBE-буфері з додаванням етидид броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркери (Set of 100 bp + 1,5 Kb DNA Ladder with stain компанії SibEnzyme).

Позитивним контролем слугували нематоди з популяції *G. rostochiensis* Ro1 колекції лабораторії нематології Інституту захисту рослин НААН. Результат ПЛР інтерпретували як позитивний, якщо в аналізованому зразку виявляли амплікон *G. rostochiensis* довжиною 423 п.н. та *G. pallida* довжиною 254 п.н.

**Результати досліджень.** За використання мультіплексної ПЛР у пробах з 3-х областей країни (Тернопільської, Закарпатської,



**Результати мультіплексної видоспецифічної ПЛР з ідентифікації картопляних цистоутворювальних нематод:** 1. Маркер молекулярних мас — Set of 100 bp + 1,5 Kb DNA Ladder with stain компанії SibEnzyme. 2. *G. rostochiensis* Ro 1, позитивний контроль. 3. Негативний контроль. 4. *G. rostochiensis*, Чернівецька обл., Путильський р-н, с. Поркулина. 5. *G. rostochiensis*, Закарпатська обл., Міжгірський р-н, с. Майдан. 6. *G. rostochiensis*, Закарпатська обл., Рахівський р-н, с. Сурупи. 7. *G. rostochiensis*, Закарпатська обл., Рахівський р-н, с. Ясіня. 8. *G. rostochiensis*, Закарпатська обл., Велико-Березнянський р-н, с. Жорнава

Чернівецької) виявили амплікон розміром 423 п.н., характерний для *G. rostochiensis* (рисунок).

Наявність в агарозному гелі в окремих випадках «шлейфа» фрагментів ДНК (див. рисунок, лінія 8) свідчить про доцільність подальшої валідації методу з використанням ширшої панелі зразків цистоутворювальних нематод із різних регіонів України. Це дасть змогу точніше визначити ступінь аналітичної специфічності методу, що відображує його якісну сторону, зокрема спроможність розрізняти в зразках ймовірно близькоспоріднені види нематод, поліморфізм яких за обраним генетичним маркером може істотно відрізнятися.

Попередніми дослідженнями було доведено ефективність використання методу для ідентифікації 60-ти популяцій картопляних цистоутворювальних нематод із 13-ти областей країни [9], інші види цистоутворювальних нематод до схеми досліджень не введено.

З метою валідації методу доцільно здійснювати також подальші дослідження з використанням інших видів цистоутворювальних нематод.

Проведені дослідження підтвердили факт поширення *G. rostochiensis* у межах Тернопільської, Закарпатської та Чернівецької областей, що відповідає даним Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України.

Нині із зазначених областей найбільшу площу угідь, заселених золотистою картопляною нематодою, реєструють у Тернопільській області — 375,02 га (ДУ «Тернопільська обласна фітосанітарна лабораторія»). У межах 2-х інших областей вогнища *G. rostochiensis* було виявлено на присадибних ділянках на площах 16,75 га (Закарпатська) та 0,61 га (Чернівецька області).

Одержані результати було покладено в основу рекомендацій щодо здійснення фітосанітарного контролю в межах заражених територій для ефективної локалізації та ліквідації виявлених карантинних вогнищ.

## Висновки

За використання мультиплексної полімеразно-ланцюгової реакції зі специфічними праймерами, комплементарними рибосомному гену 18S та внутрішньому транскрибованому спейсеру ITS1, встановлено поширення *G. rostochiensis* у межах Тернопільської, Чернівецької та Закарпатської

областей. Розташування карантинних вогнищ у переважній більшості припадає на присадибні ділянки населення. Підтверджено доцільність подальшої валідації методу за використання ширшої панелі зразків цистоутворювальних нематод із різних регіонів України.

## Бібліографія

1. Anthoine G. Variability of the ITS rDNA and identification of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne&Allen, 1944 (*Nematoda: Pratylenchidae*) by rDNA amplification/G. Anthoine, D. Mugniery// *Nematology*. — 2005. — V. 7. — P. 503–516.
2. *Biochemical and molecular characterization of plant-parasitic nematodes*/I. Abrantes, M. Santos, L.I. Conceicao et al.//*Phytopathol. Mediterr.* — 2004. — V. 43. — № 2. — P. 232–258.
3. Blok V.C. Molecular diagnostics for plant — parasitic nematodes/V.C. Blok//*Nematology Monographs and Perspectives*. — 2003. — V. 2. — P. 1–12.
4. Bulman S.R. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR)/S.R. Bulman, J.W. Marshall//*New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. — 1997. — V 25. — P. 123–129.
5. Castagnone C. Satellite DNA-based species specific identification of single individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (*Nematoda: Aphelenchoididae*)/C. Castagnone, P. Abad, P. Castagnone-Sereno//*European J. of Plant Pathology*. — 2005. — V. 112. — P. 191–193.
6. Fenwick D.W. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil/D.W. Fenwick//*J. of Helminthology*. — 1940. — V. 18. — P. 155–172.
7. Ferris V. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes/V. Ferris, J.M. Ferris, J. Faghghi//*Fundamental and Applied Nematology*. — 1993. — V. 16(2). — P. 177–184.
8. *Identification of Ditylenchus species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA—ITS regions*/M. Kerkoud, M. Esquibet, O. Plantard et al.//*European J. of Plant Pathology*. — 2007. — V. 118. — P. 323–332.

9. *Identification of Globodera rostochiensis and G. pallida in the Ukraine by PCR/L.A. Pylypenko, T. Uehara, M.S. Phillips et al./European J. of Plant Pathology. — 2005. — V. 111. — P. 39–46.*

10. *ITS–RFLP analysis, an efficient tool for identification of Bursaphelenchus species/W. Burgermeister, H. Braasch, K. Metge et al./Nematology. — 2009. — V. 11(5). — P. 649–668.*

11. *Molecular characterisation of Chinese Heterodera glycines and H. avenae populations based on RFLPs and sequences of rDNA–ITS regions/J. Zheng, S.A. Subbotin, L. Waeyenberge, M. Moens// Russian Journal of Nematology. — 2000. — V. 8. — P. 109–113.*

12. *Molecular diagnosis, taxonomy, and phylogeny*

*of the stem nematode Ditylenchus dipsaci species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA/S.A. Subbotin, M. Madani, E. Krall et al./Phytopathology. — 2005. — V. 95. — P. 1308–1315.*

13. *Oliveira C.M.G. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done/C.M.G. Oliveira, A.R. Monteiro, V. Blok//Tropical Plant Pathology. — 2011. — V. 36(2). — P. 65–73.*

14. *Wishart J. Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for Meloidogyne chitwoodi, M. fallax and M. hapla/J. Wishart, M.S. Phillips, V.C. Blok//Phytopathology. — 2002. — V. 92. — P. 884–892.*

Надійшла 10.08.2015.

## РЕЦЕНЗІЇ

### ПЕРША ІСТОРІЯ НАУКИ АГРОХІМІЇ В УКРАЇНІ

У 2015 р. вийшла друком монографія академіка НААН Б.С. Носка «Сторінки історії агрохімічних досліджень в Україні» (Х.: ТОВ «Щедра садиба плюс», 2015. — 290 с.), яка вміщує нариси про видатних учених-агрохіміків, що працювали в галузі агрохімічних досліджень в Україні в період з останньої чверті XIX і до початку XXI ст. Окремі розділи присвячено висвітленню ролі провідних навчальних і наукових закладів у підготовці наукових кадрів в агрохімії, а також історії становлення агрохімічної служби в Україні.

Ця робота поповнила сформовану останніми роками оновлену історіографічну базу, що містить видання з історії НААН, аграрної науки та окремих її галузей. Праця академіка Б.С. Носка вирізняється своєю фундаментальністю у розкритті предмета дослідження, комплексним підходом до його вивчення, а також глибокофаховим розумінням причин і наслідків змін в історичному розвитку агрохімічної науки, адже учений брав безпосередню участь у найважливіших наукових дослідженнях з цього напрямку. Саме тому представлена книга відзначається об'єктивізмом в оцінках подій і фактів, й особливо щодо їх персоналізованого наповнення.

Найповніше відтворити еволюцію галузі автору вдалося завдяки логічному підходу до побудови структури видання. Визначаючи, що класична сільськогосподарська дослідна справа утвердилася завдяки діяльності видатних учених-аграріїв, які творили національну науку, Б.С. Носка на початку своєї монографії приділяє значну увагу фундаторам агрохімічної науки в Україні — А.Є. Зайкевичу, М.А. Єгорову, Б.М. Рожественському, С.Л. Франкфурту, О.І. Душечкіну, П.А. Власюку та ін.

У наступних розділах досить повно розкрито внесок у розвиток агрохімічних досліджень наукових установ і навчальних закладів, що діяли на теренах сучасної України у різні роки, починаючи від заснування Полтавського дослідного поля й дотепер. Особливий інтерес становить матеріал, що стосується західного регіону України, адже велика строкатість його ґрунтового покриву зумовила необхідність проведення численних агрохімічних досліджень на цій території. Однак висвітлення їх результатів зазвичай відбувалося лише на регіональному рівні у місцевих наукових виданнях, що обмежувало доступ до них широкого загалу науковців.

Розділ, що стосується історії агрохімічної служби в Україні та ролі наукових установ у її становленні й розвитку, розкриває діяльність зональних агрохімічних лабораторій, лабораторій агрохімії науково-дослідних установ, а також результати їх досліджень. Узагальнено історичний поступ керівних об'єднань агрохімічної служби, наведено основні етапи і хронології її реорганізації.

Зрозуміло, що за підготовки будь-якої історичної роботи важко уникнути однобічності у висвітленні матеріалу. Це стосується, зокрема, 6-го розділу, який потребує досить істотних доповнень і доопрацювання.

Книга академіка Б.С. Носка покликана вирішувати найактуальніші для нашої держави завдання в часи чергових випробувань, а саме — формування складових національної ідеї.

**В.А. Вергунов,**  
член-кореспондент НААН,  
директор ННСГБ НААН