

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ САДОВОДСТВА,
ВИНОГРАДАРСТВА И ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

На правах рукописи

УДК 634.1[632.35+632.38](478)

ПРОДАНЮК ЛЕОНИД

**ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ
ЯБЛОНИ В СИСТЕМЕ СЕРТИФИКАЦИИ ПОСАДОЧНОГО
МАТЕРИАЛА ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР**

411.09-ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

Автореферат диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Кишинёв, 2016

Работа выполнена в Лаборатории вирусологии Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий (НПИСВПТ).

Научный руководитель:

ВОЛОЩУК Леонид,

доктор хабилитат биологических наук,
профессор исследователь, ИГФЗР.

Научный консультант:

ДАДУ Константин,

доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
конференциар исследователь, НПИСВПТ.

Официальные оппоненты:

ПАМУЖАК Николай,

доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
профессор, ГАУМ;

ТЕРТЯК Дмитрий,

доктор биологических наук, НПИСВПТ.

Состав специализированного учёного совета:

Председатель

РАПЧЯ Михаил

доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
профессор исследователь, НПИСВПТ;

Ученый секретарь совета

СОЛДАТЕНКО Евгения

ВРОНСКИХ Михаил

доктор хабилитат технических наук, НПИСВПТ;
доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
профессор, член корр., АНМ, ИПК «Селекция»;

ВОЙНЯК Василий

доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
профессор, ИГФЗР;

КРОИТОРУ Никита

доктор сельскохозяйственных наук, ГАУМ.

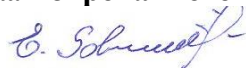
Защита состоится «28» сентября 2016 г. в 14:00 на заседании Специализированного ученого совета D 62.411.09 – 01 при Научно-Практическом Институте Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий, мун. Кишинев, г. Кодру, ул. Виерул 59, Республика Молдова.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Научно-Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий, мун. Кишинев, г. Кодру, ул. Виерул 59 и на веб-сайте CNAА (www.cnaa.md).

Автореферат разослан «28» августа 2016 года.

Ученый секретарь. Специализированного

совета D 62. 411.09 – 01:



Солдатенко Евгения,

доктор хабилитат технических наук,
конференциар исследователь.

Научный руководитель:



Волощук Леонид,

доктор хабилитат биологических наук,
профессор исследователь.

Научный консультант:



Дадю Константин,

доктор хабилитат сельскохозяйственных наук,
конференциар исследователь.

Автор



Проданюк Леонид

©Prodaniuc Leonid, 2016

КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Актуальность темы. В июне 2013 года в «Мониторул Официал» № 136-139 было опубликовано Постановление Правительства № 415 об утверждении Норм производства, контроля, сертификации и реализации свободного от вирусов материала для размножения и посадки плодовых культур. Документ гармонизирован с законодательными актами Европейского Союза и является обязательным условием интеграции Республики Молдова в Европейский союз [2].

Известно, что вирусы не обладают собственным метаболизмом и для репродукции используют механизмы и процессы, которые происходят в клетках растений-хозяев. Поэтому все активные вещества, способные подавлять синтез вирусов в зараженных растениях, одновременно снижают продуктивность растений. Поскольку химические средства защиты не эффективны против вирусных и вирусоподобных болезней, основные меры борьбы с ними направлены на получение свободных от вирусов исходных клонов и их размножение в условиях защиты от вторичного заражения, то есть введение системы сертификации посадочного материала.

Описание состояния в данной области и определение задач исследований.

В свете сказанного большое значение приобретают методы диагностики вирусных болезней. Постоянное их совершенствование позволяет надёжно контролировать фитосанитарное состояние как базисных маточников, так и посадочного материала. Впервые такая система была разработана в США в середине прошлого века и успешно применена на практике после многолетних эпифитотий, приведших плодородческую отрасль к опустошительным последствиям. В настоящее время в странах, где производство фруктов играет важную роль в экономике, эта задача решается в рамках национальных программ системы сертификации семенного и посадочного материала, что позволяет повысить продуктивность насаждений, а в ряде случаев сократить площадь под культурами. Так, в Голландии перевод плодородства на безвирусную основу в 1970–1980 годы позволил в 3,5 раза увеличить производство фруктов и одновременно сократить площади под садами [1]. В Молдове работы по получению безвирусных клонов и выращиванию оздоровленных саженцев плодовых культур были начаты по инициативе профессора Д.Д. Вердеревского в середине 70-х годов прошлого столетия. За короткое время в лаборатории вирусологии под руководством Т.Д. Вердеревской в тесном сотрудничестве с вирусологами Института фитопатологии города Ашерслебен (Германия) была разработана технология получения и размножения свободного от вирусов и

вирусоподобных патогенов посадочного материала, которая послужила основой перевода плодового питомниководства республики на безвирусную основу. Однако разработанная технология не была реализована из-за перестроечных процессов 90-х годов прошлого столетия. Кризис, вызванный переходом экономики к рыночным отношениям, отрицательно отразился и на питомниководческой отрасли стратегических сельскохозяйственных культур Республики Молдова. Проблема качества приобрела особую актуальность, поскольку широкое развитие частного садоводства привело к стихийному характеру производства и реализации посадочного материала, бесконтрольному ввозу в страну экономически нестабильных сортов. В связи с отсутствием системы надёжного контроля качества, фитосанитарного состояния маточных насаждений и импортируемого посадочного материала возникла угроза широкого распространения опасных для Молдовы вирусных, грибных и бактериальных болезней, а также их переносчиков.

Тем временем страны европейского содружества ввели единую систему сертификации, предусматривающую осуществлять обмен и реализацию растительных ресурсов сертифицированным, то есть свободным от вирусов и других хронических инфекций, посадочным материалом. Для Республики Молдова это грозило невозможностью обмена и экспорта растительным материалом без предварительного тестирования и оздоровления его с соблюдением международных норм и методов. В 1996 году Парламент Республики Молдова принял «Закон о Плодоводстве», в котором указывалось о необходимости перевода плодового питомниководства на безвирусную основу и международные нормы сертификации. Выполнение этого ответственного задания было возложено на Институт Плодоводства [3].

Для этого в лаборатории вирусологии были возобновлены работы по созданию коллекции свободных от вирусов сортов и подвоев плодовых культур. Одновременно был разработан технологический регламент, в котором описывались этапы внедрения системы перевода плодового питомниководства на безвирусную основу. Основные положения этого документа соответствовали схеме сертификации посадочного материала, опубликованного странами европейского содружества в начале 90-х годов прошлого столетия. В данной схеме основное внимание уделялось вопросам проверки безвирусных клонов и посадочного материала на чистоту от вирусов надёжными лабораторными методами. В процессе выполнения сказанного в Лаборатории Вирусологии были оптимизированы рекомендованные Европейской организацией по защите растений EPPO/OEPP [8, 9] методы диагностики механически переносимых вирусов, описанных

ранее в республике. Не изученным оставался только один патоген из группы латентных вирусов семечковых культур – вирус ямчатости древесины яблони (ВЯДЯ). Восполнению этого пробела посвящена данная работа.

Цели и задачи исследований. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони и применение их в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур, согласно европейским стандартам сертификации. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- ◇ Выявить и идентифицировать вирулентные штаммы ВЯДЯ.
- ◇ Определить реакцию на перенос ВЯДЯ на травянистые индикаторы.
- ◇ Оптимизировать методику очистки ВЯДЯ.
- ◇ Разработать диагностическую антисыворотку к ВЯДЯ.
- ◇ Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики ВЯДЯ.
- ◇ Внедрить оптимизированные методы диагностики в систему сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Методология научных исследований базируется на результатах теоретических и прикладных разработок, зарегистрированных и общепринятых на национальном и международном уровнях. Разработанные методологические подходы позволили использовать комплекс методов и приемов вирусологических исследований, направленных на идентификацию, определение иммунологических особенностей и оптимизацию диагностики ВЯДЯ, разработке приемов оздоровления и контроля качества посадочного материала, применяя дескриптивные, статистические и аналитические методы. Они основываются на *принципах* оптимизации методов диагностики ВЯДЯ, способах применения оптимизированных методов в системе сертификации посадочного материала, *концепции* улучшения биологических качеств посадочного материала семечковых культур, способах повышения продуктивности плодовых семечковых насаждений в Республике Молдова.

Научная новизна и оригинальность. В результате исследований усовершенствованы и оптимизированы иммунологические методы ИФА и ИСЭМ и молекулярно-генетический метод ОТ-ПЦР. Получена высокоспецифическая антисыворотка к ВЯДЯ с титром 1:1800, 1:2048. На базе полученной антисыворотки приготовлены диагностические наборы для проведения метода ИФА. Для этого применены различные сорбенты для выделения фракции IgG из сыворотки в частности BrCN сефароза с Protein A и сефароза CL-4B Protein A. При применении собственных

антисывороток оптимизирован метод «immunocapture», позволяющий удешевить выделение антигена из растительного сока для тестирования методом ОТ-ПЦР. Новыми являются так же данные о том, что:

- ослабление растений индикатора перед заражением способствует хорошей передаче вируса;
- применение буферных смесей с добавками антиоксидантов для стабилизации окислительно-восстановительных процессов увеличивает процент зараженных растений;
- выращивание растений индикатора в режиме короткого дня способствует лучшему накоплению вируса;
- применение при очистке вируса TRITON-X-100 увеличивает концентрацию вируса и приводит к раздроблению агрегированных частиц;
- применение сыворотки на стадии пробоподготовки ОТ-ПЦР удешевляет метод в 22,9 раза по сравнению с классическим выделением антигена.

Решенная важная научная проблема *состоит в научном обосновании методологических подходов, направленных на усовершенствование и оптимизацию методов диагностики ВЯДЯ в системе производства безвирусного посадочного материала. На основании результатов исследований специфичности полученных антисывороток, усовершенствования оптимизированных методов и определения календарных сроков проведения тестирования ВЯДЯ. Это позволило разработать, усовершенствовать и применить оптимизированные методы в системе сертификации безвирусного посадочного материала семечковых культур.*

Теоретическое значение работы состоит в разработке и усовершенствовании надёжных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони, подбор надёжных растений индикаторов, использование антиоксидантов для стабилизации окислительно - восстановительных процессов искусственного инфицирования и очистки вирусных экстрактов, повышения титра полученной антисыворотки и использование метода «immunocapture» для увеличения эффективности ОТ-ПЦР, усовершенствование приёмов выполнения ИСЭМ для тестирования и ретестирования плодового посадочного материала, что послужит в качестве теоретической основы экспресс-методов тестирования двух других латентных вирусов яблони. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики позволит решить ряд теоретических и практических задач по переводу плодового питомниководства на международные нормы сертификации.

Практическая ценность работы состоит в применении оптимизированных методов в работах по отбору кандидатов в безвирусные клоны, для тестирования и

ретестирования маточно-черенковых садов и подвойных маточников категории «Пребаза», «База» и «Сертификат», а также тестирования ввозимого посадочного материала плодовых семечковых культур [4, 5]. Это значительно ускоряет перевод питомниководства Республики Молдова на безвирусную основу и Европейские нормы сертификации плодового посадочного материала. Полученные данные можно использовать для оптимизации биологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов диагностики других латентных вирусов яблони.

Основные тезисы, выдвигаемые на защиту

1. Получение диагностической поликлональной антисыворотки к вирусу ямчатости древесины яблони.
2. Оптимизация условий проведения метода иммуноферментного анализа.
3. Усовершенствование метода иммуноэлектронной микроскопии для диагностики ВЯДЯ.
4. Оптимизация метода полимеразной цепной реакции для диагностики ВЯДЯ.
5. Применение метода «immunosapture» на стадии пробоподготовки ОТ-ПЦР.
6. Применение оптимизированных методов в системе сертификации плодового посадочного материала.

Внедрение научных результатов. Результаты работы внедрены в лаборатории вирусологии НПИСВиПТ и применяются в работах по получению безвирусных клонов и в хозяйствах республики: SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” в питомниках семечковых культур.

Апробация научных результатов. Материалы работы доложены и обсуждены: на заседании Лаборатории вирусологии (14.07.2015) Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологии, на VI Международной конференции «Биоресурсы и вирусы», г. Киев, Украина (14.17.2010), на Кафедре вирусологии Киевского национального университета им. Т.Г. Шевченко в рамках билатерального проекта «Молекулярно-биологический анализ вируса ямчатости древесины яблони в коммерческих насаждениях Молдовы и Украины и поиск устойчивых сортов» (10.11.2011), на Международной научной конференции посвященной 75-летию Олега Метлицкого, Москва, Россия (18.03.2013).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ: 5 статей в изданиях, рекомендованных Национальным советом по аккредитации и аттестации Республики Молдова, из них 2 без соавторов, и 6 в международных изданиях.

Объём и структура работы: Работа изложена на 100 страницах машинописного текста и состоит из аннотаций на румынском, русском и английском языках, списка условных сокращений, введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, 2 главы собственных экспериментальных данных), общих выводов, практических рекомендаций, списка цитированной литературы, (164 библиографических источников) и приложений. Работа содержит 25 рисунков, 12 таблиц, 16 приложений.

Ключевые слова: вирус, ямчатость, яблоня, оптимизация, методы, семечковые породы, тестирование, сертификация.

СОДЕРЖАНИЕ

Во введении отражены актуальность и значимость темы исследования, цели и задачи диссертации, методология научных исследований, научная новизна полученных результатов, решенная важная научная задача, теоретическая и практическая значимость работы, апробация результатов и выводы.

1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ИЗУЧЕННОСТИ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ

Представлен детальный анализ научных трудов и синтез накопленных знаний в исследовании вируса ямчатости древесины яблони. Особое внимание уделено вопросам заболеваний, вызываемых данным вирусом на различных семечковых породах, таких как яблоня, груша, айва, а также методам тестирования патогена, принятых в мировой практике. Проанализированы методы идентификации вируса и применение их в производстве посадочного материала.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в Лаборатории вирусологии Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий.

Материалом исследований служили:

- изоляты вируса ямчатости древесины яблони 3/53/20, 1/17/63, 3/38/63, 3/50/37, 3/52/42, 3/38/80, 3/37/80, 2/22/22, 3/32/11, 1/15/13, 1/9/63 и груши №2, №3 и №4, выделенные в коллекционном саду Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий; - изоляты вируса ямчатости древесины яблони 10/21, G-12 из коллекции Института плодородства города Киев (Украина); - изоляты вируса ямчатости древесины яблони SP-3, VC-7 из коллекции Института плодородства города Прага (Чехия); - антисыворотки к вирусу ямчатости древесины яблони, любезно предоставленные доктором Yanase (Япония) с титром 1:2000 и полученные ранее в

лаборатории вирусологии с титром 1:2000; - кит для выделения тотальной РНК коммерческой фирмы Qiagen, Great Britain; - кит для проведения ОТ-ПЦР реакции коммерческой фирмы Invitrogen, USA.

В работе использовались биологические, биохимические, иммунологические и молекулярно-генетические методы, применяемые в фитовирусологии.

3. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

В результате собственных исследований установлено, что не все изоляты вируса ямчатости древесины яблони стабильно переносятся на травянистые индикаторы. В зависимости от вирулентности изолята, вида травянистого индикатора, фотопериода и температуры происходит различное накопление вирусных частиц. При очистке ВЯДЯ с травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis* 37B удалось получить очищенный препарат вируса, пригодный для иммунизации кроликов. Применённая нами схема иммунизации животных, состоящая из 3 иммунизаций и 2 реиммунизаций, позволила получить высокоспецифичную антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони.

3.1. Выявление изолятов ВЯДЯ

Выявление изолятов ВЯДЯ проводили в период цветения семечковых культур в коллекционно-селекционном саду НПИСВиПТ с целью отбора вирулентных штаммов вируса ямчатости древесины яблони, для переноса и последующих исследований на древесных и травянистых индикаторах. Наличие ВЯДЯ в отобранных образцах определяли методом иммуноэлектронной микроскопии с использованием антисыворотки к исследуемому вирусу предоставленной доктором Yanase (Япония), [11]. В качестве источника вирусных частиц использовали экстракты из лепестков, в тканях которых накапливается наибольшее количество частиц двух других нитевидных вирусов яблони - хлоротической пятнистости листьев и бороздчатости древесины яблони.

Препараты готовили на палладированных сетках, покрытых коллодиевой пленкой и укрепленных углём в вакуумном испарителе ВУП-4.

Готовые препараты сканировали в электронном микроскопе TESLA BS-500 при увеличении 14000. Критерием отбора изолятов служило наибольшее количество выловленных на сетке частиц вируса. В результате проведенных исследований было отобрано 11 изолятов ВЯДЯ из яблони и три изолята ВЯДЯ из груши.

3.2. Перенос и накопление вируса на древесных и травянистых тест - растениях

Отобранные изоляты ВЯДЯ были перенесены на древесные индикаторы с целью сохранения и сравнения их реакции в ответ на заражение ВЯДЯ с описанными в

литературе симптомами. В качестве индикаторов для диагностики были использованы рекомендуемые Европейским комитетом по кооперации исследований вирусных заболеваний плодовых культур индикаторы *SPY-227* и *Virginia crab*. Кроме описанных индикаторов, выделенные изоляты ВЯДЯ переносили и на индикаторные растения *R-12740/7A*, а также *Malus coronaria* Morton. Заражение индикаторов проводили в питомнике на однолетних сеянцах стандартным методом двойной окулировки или щитком. В каждом варианте окулировали по пять растений, шестое растение оставляли в качестве контроля. Учёты в питомнике проводили в августе второго учётного года.

На первый-второй год после заражения на *SPY-227* мы наблюдали симптомы подавления роста, на третий год после заражения произошло отмирание *SPY-227* (как и описывается в литературе) (рис. 1). Мы перенесли ВЯДЯ на древесный индикатор *Virginia crab* и на третий год после заражения мы наблюдали ямчатость древесины *Virginia crab* (рис. 2) и деформацию плодов *Virginia crab* (рис. 3).



Рис. 1. Отмирание *SPY-227*



Рис. 2. Ямчатость древесины *Virginia crab*.



Рис. 3. Деформация плодов *Virginia crab*.

На других древесных индикаторах *Malus coronaria* Morton и R-12740/7A поражения ВЯДЯ мы не наблюдали никаких видимых симптомов.

Методом иммуноэлектронной микроскопии нами так же было протестировано 50 сортов и 102 гибрида яблони для определения степени распространённости ВЯДЯ и двух других латентных вирусов яблони - хлоротической пятнистости листьев яблони и бороздчатости древесины яблони в обследуемых насаждениях Института Плодоводства [7]. Результаты обследования коллекции сортов и гибридов яблони на заражение вирусом ЯДЯ и двумя другими латентными вирусами яблони представлены в таблице 1.

Таблица 1. Зараженность сортов и гибридов латентными вирусами яблони

	Вирус ЯДЯ %	Вирус ХПЛЯ %	Вирус БДЯ %	Комплекс ЯДЯ+ХПЛЯ %	Всего заражено %
Сорта	48±14,2 33,8÷62,2	54±14,3 39,7÷68,3	42±14 28÷56	52±14,4 37,6÷66,4	64±13,8 50,2÷77,8
Гибриды	10,7±6,3 4,7÷17,3	9,8±5,7 4,1÷15,5	12,7±6,5 6,2÷19,2	8,8±5,3 2,7÷13,3	13,7±6,7 6,3÷19,7

Данные приведённые в таблице 1, показывают, что сорта яблони в коллекции Института заражены латентными вирусами на 64 %, а гибриды на 13,7%. На 52% сорта заражены комплексом вирусов ямчатости древесины яблони и хлоротической пятнистости листьев яблони. Вирусом ямчатости древесины яблони сорта коллекции заражены на 48%, а гибриды на 10,7%. Вирусом бороздчатости древесины яблони и вирусом хлоротической пятнистости яблони на 42% и 54% соответственно.

Для переноса исследуемого вируса на травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis* 37В были использованы 14 изолятов из коллекции нашего института и четыре изолята из коллекции институтов садоводства города Киев (Украина) и плодородства города Прага (Чехия) с использованием различных буферных смесей и стабилизирующих добавок. Из указанного выше числа изолятов только два образца 3-32-11 и 3-53-20 проявили симптомы на зараженных растениях индикатора *N.occidentalis* 37В. При первичном переносе на 27-29 день после заражения на отрастающих листьях некоторых растений индикатора появлялись симптомы в виде просветления жилок 2-3 порядка и жилковой мозаики (рис 4). Зараженные растения индикатора использовали для проведения серии пассажей на растения того же индикатора с целью накопления вируса в их тканях в количествах, необходимых для получения очищенных препаратов исследуемого вируса. Однако результаты первого же пассажа показали, что изолят 3-53-20 легко заражает

здоровые растения индикатора, в тканях которого вирус накапливается по данным иммуноэлектронной микроскопии уже на 12-16 день после заражения.

Для получения очищенных препаратов ВЯДЯ периодически заражали необходимое количество растений индикатора *N.occidentalis 37B*, используя при этом 0,05 М рН 7,8 К/Na-фосфатный буфер с добавлением 0,1% сульфита натрия, 0,1% аскорбиновой кислоты и 0,1% тиоглицерола.

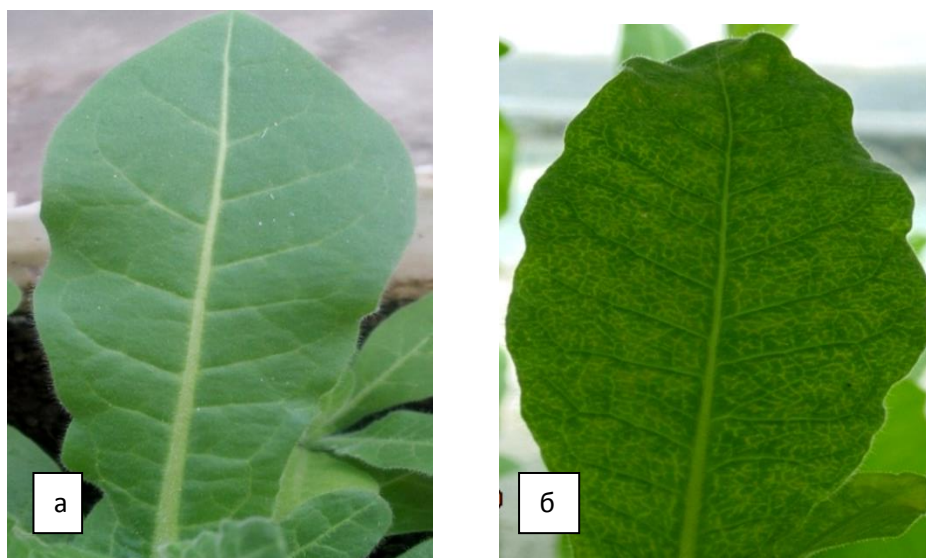


Рис. 4. Реакция травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis 37B* на заражение ВЯДЯ.

а - Лист здорового травянистого индикатора *Nicotiana occidentalis 37B*.

б - Травянистый индикатор *Nicotiana occidentalis 37B* с симптомами вируса ямчатости древесины яблони (просветление жилок 2-3 порядка, жилковая мозаика).

3.3. Получение очищенных препаратов ВЯДЯ

Успешная экстракция вирусных частиц из клеток заражённых тканей во многом зависит от этапа осветления растительного сока. На этом этапе очистки из исследуемого экстракта удаляются мелкие механические ткани, органеллы и другие компоненты клеток, а также низкомолекулярные белки. Их удаление осуществляется различными активными или нейтральными химическими соединениями и изменением кислотности растительного сока.

В исследованиях по разработке метода очистки молдавского изолята вируса ЯДЯ мы применили разработки японских исследователей [11] с некоторыми изменениями, взятыми из разработок голландских исследователей [10], которые касались первого этапа очистки, а именно, осветления растительного экстракта. Вместо осветления растительного экстракта гелем, который образуется при добавлении в экстракт двухзамещённого фосфата натрия и хлористого кальция, мы использовали TRITON X-100. Кроме того,

перед началом процесса очистки заражённые листья замораживали в течение 24 часов при температуре 20-22⁰С. Таким образом, осветлённый растительный экстракт ультрацентрифугировали при 90000 g в течение 90 мин. Полученный осадок суспендировали и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин для удаления примеси. Предварительно очищенную вирусную суспензию далее очищали по методике японских исследователей. Осветлённый препарат, центрифугировали на 20% сахарозной подушке при 120000g в течение 90 мин. Полученный осадок суспендировали в 0,01М Na-фосфатном буфере с добавлением 0,5% Тритона X-100. После низкоскоростного центрифугирования препарат центрифугировали на 30% сахарозной подушке при тех же условиях. Осадок суспендировали в 0,01М боратном буфере pH-8,0. Для дальнейшей концентрации вируса мы проводили фракционирование препарата в градиенте плотности сахарозы 10-40%. После фракционирования в градиенте плотности сахарозы наблюдали опалесцирующую зону, которую отбирали шприцом, разбавляли не менее чем в 5 раз и концентрировали ультрацентрифугированием.

Полученная нами спектрофотометрическая кривая очищенного препарата, полученного по оптимизированной методике, имела один пик с минимумом при длине волны 240 нм и с максимумом при длине волны 258 нм, что характеризовало препарат как нуклеопротеид (рис 5).

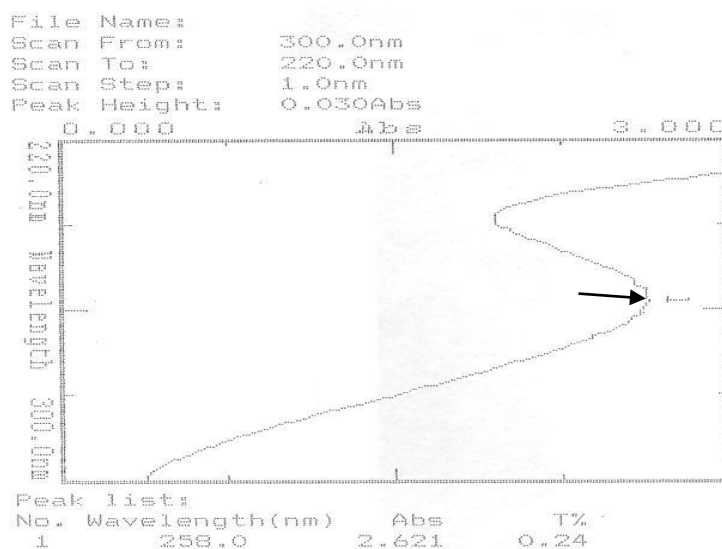


Рис. 5. Спектрофотометрическая кривая очищенного препарата ВЯДЯ.

→ Указан максимум при длине 258 нм.

Такие препараты очищенного вируса были использованы для иммунизации подопытных животных.

3.4. Получение антисыворотки и определение её качества

Для получения антисывороток к ВЯДЯ нами была применена короткая схема иммунизации, состоящая из трёх инъекций подопытным кроликам с недельным интервалом и двух реиммунизаций в момент падения титра антисыворотки до минимального значения. Для иммунизации были отобраны кролики №7 и №17 породы «Белый великан» весом 2500-2800 граммов соответственно. Количество вводимого препарата вируса составляло 200-300 мкг/мл. Первую инъекцию проводили с применением полного адьюванта Фрейнда, вводя вирусный препарат вдоль позвоночника подкожно. Через одну неделю вирусный препарат с неполным адьювантом Фрейнда вводили подопытным кроликам в большую мышцу задних ног. Третья инъекция проводилась введением чистого вирусного препарата в большие вены ушей кроликов.

Для восстановления активности антител на 62 день от начала иммунизации животные были дважды реиммунизированы с недельным интервалом. Полученная антисыворотка с высоким титром использовалась в дальнейшем для получения диагностического набора к исследуемому вирусу и оптимизации метода ИФА.

4. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВЯДЯ

Получены данные по оптимизации условий проведения метода иммуноферментного анализа, иммуноэлектронной микроскопии и полимеразной цепной реакции для диагностики ВЯДЯ. Отработаны методы выделения IgG с применением различных сорбентов. Оптимизирован трехстадийный метод проведения ИФА. Установлено, что применение двухстадийного ИФА нецелесообразно для нитевидного вируса ямчатости древесины яблони. Оптимизирован иммунологический метод иммуноэлектронной микроскопии и молекулярно-генетический метод ОТ-ПЦР для диагностики ВЯДЯ. На базе антител, выделенных из диагностической антисыворотки, оптимизирован метод, позволяющий проводить пробоподготовку ОТ-ПЦР более дешёвым способом.

4.1 Оптимизация условий проведения метода иммуноферментного анализа для диагностики ВЯДЯ

При разработке условий проведения ИФА вируса ВЯДЯ мы изучали различные концентрации иммуноглобулинов и разведения конъюгатов. При различных разведениях

иммуноглобулинов и конъюгата мы получили различные показания оптической плотности.

Для сенсibilизации микроплат использовали иммуноглобулины в разведении 1:250; 1:500; 1:750; 1:1000. Иммуноглобулины разводили в карбонатном буфере pH-9,6. Адсорбцию антител на микроплатах проводили в течение ночи в холодильнике при температуре +4⁰C или 30 мин в термостате при +37⁰C.

В процессе приготовления конъюгата во время диализа изменяется объём глобулинов, поэтому конъюгат мы применяли не в абсолютной концентрации, а в разведениях 1:500; 1:750; 1:1000.

В качестве источника вируса использовали сырой сок индикаторного растения *Nicotiana occidentalis 37B*. Показания оптической плотности (экстинции) снимали на фотометре при длине волны 405 нм. Для определения оптимальных условий диагностики молдавского изолята ВЯДЯ мы использовали трехстадийный вариант метода ИФА с последовательным инкубированием микроплат иммуноглобулинами, экстрактом растительного сока и конъюгата. Первая стадия инкубации заключалась в сенсibilизации микроплат иммуноглобулинами в различном разведении. Адсорбцию проводили в течение трех часов при t+37⁰C в термостате. После трехкратной промывки микроплат промывочным буфером следовала вторая стадия, при которой проводили инкубацию растительного экстракта, полученного из листьев индикаторного растения *Nicotiana occidentalis 37B* с симптомами вируса ямчатости древесины яблони. Гомогенизированный и осветлённый низкоскоростным центрифугированием растительный экстракт инкубировали в течение 3 часов при t+37⁰C в термостате. Затем микроплаты промывали 3 раза промывочным буфером. Заключительная стадия состояла из инкубации конъюгата в различных разведениях, которую проводили в течение 3 часов при t+37⁰C в термостате. После инкубирования конъюгата проводили 3-х разовую промывку и наносили субстратный буфер, состоящий из диэтаноламина и нитрофенилфосфата. Через 30 мин снимали показания оптической плотности при длине волны 405 нм. При использовании разведения иммуноглобулинов 1:1000, конъюгата 1:750 и разведения растительного сока в соотношении 1:10, нами были получены наивысшие показания оптической плотности. Данные разведения являются оптимальными для проведения иммуноферментного анализа молдавского изолята вируса ямчатости древесины яблони.

Результаты оптимизации трехстадийного варианта ИФА для диагностики молдавского изолята вируса ЯДЯ приведены на (рисунке 6).

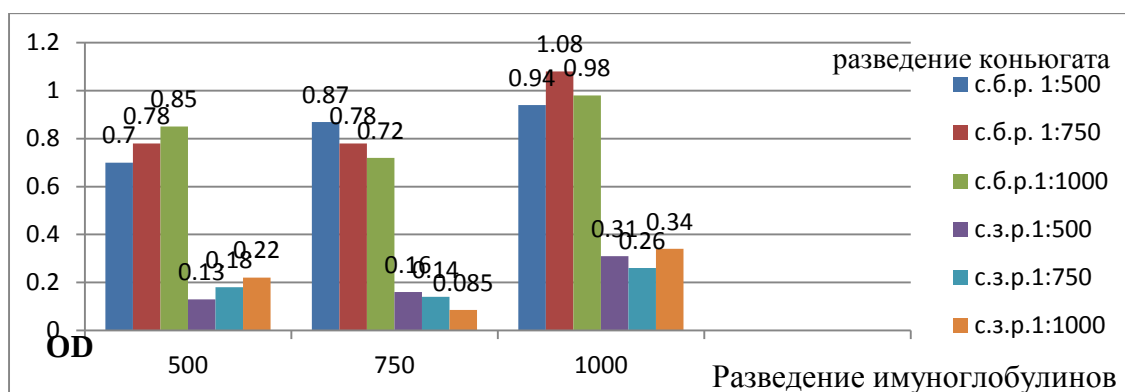


Рис. 6. Результаты оптимизации ИФА с тремя стадиями инкубации.

с.б.р. – сок больного растения, *с.з.р.* – сок здорового растения.

OD – показания оптической плотности.

Аналогичные результаты мы получали и с иммуноглобулинами, выделенными из антисывороток к ВЯДЯ с использованием в качестве сорбента BrCN активированной сефарозы с протеином А и приготовленного на их основе конъюгата.

Параллельно нами был заложен эксперимент по проведению двухстадийного варианта ИФА. Суть этого варианта заключалась в инкубировании конъюгата вместе с экстрактом растительного сока после сенсibilизации иммуноглобулинов на микроплаты. За основу были взяты те же разведения иммуноглобулинов, конъюгата и растительного сока, буферные растворы, что и в варианте ИФА с применением трех стадий инкубации. Полученные нами показания оптической плотности после окончания реакции привели нас к выводу о нецелесообразности применения двухстадийного варианта ИФА для диагностики нитевидного ВЯДЯ (Рис. 7.).

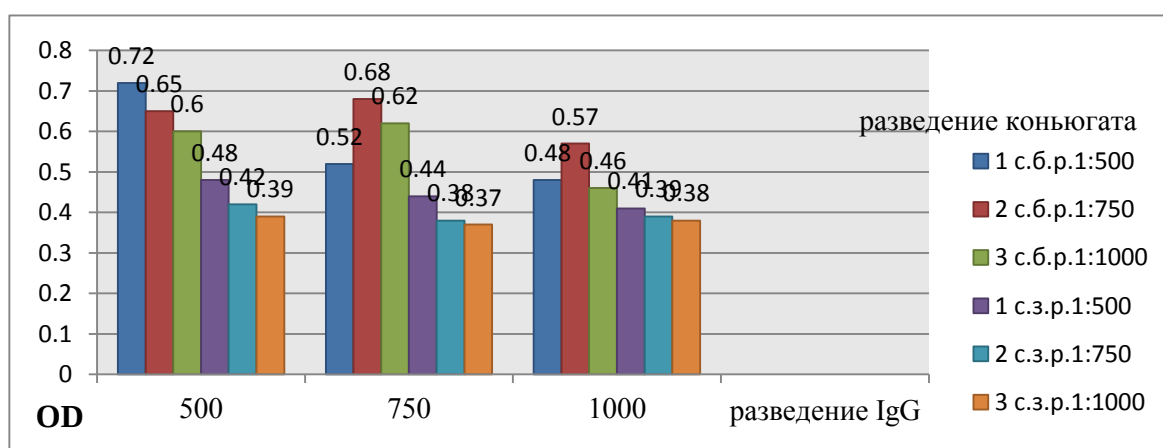


Рис. 7. Результаты оптимизации ИФА с двумя стадиями инкубации.

с.б.р. – сок больного растения. *с.з.р.* – сок здорового растения.

OD – показания оптической плотности.

Таким образом, испытания различных вариантов проведения иммуноферментного анализа показали, что для получения надёжных результатов диагностику молдавского изолята вируса ЯДЯ необходимо проводить по «сэндвич» - варианту ИФА, который включает следующие этапы.

1. Сенсибилизация микроплат иммуноглобулинами в разведении 1:1000.
2. Разведение растительного сока в соотношении 1:10.
3. Использование конъюгата в разведении 1:750.

При этом инкубирование на всех стадиях продолжается в течение трех часов при температуре +37°C.

Оптимизированная методика применялась нами в последующих исследованиях по изучению пригодности различных тканей и органов заражённых растений и сроков их отбора для диагностики вируса ЯДЯ в процессе тестирования.

На основании полученных результатов нами определены календарные сроки отбора проб для достоверной диагностики ВЯДЯ методом ИФА в системе производства безвирусного посадочного материала. Данные отражены в таблице 2.

Таблица 2. Диагностика ВЯДЯ по срокам в тканях плодовых растений методом ИФА

Исследуемые органы растения	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Искусственно пробуждённые почки	+	+	+									
Естественно пробуждённые почки			+	+								
Лепестки				+	+							
Кора и листья активно растущих побегов				+	+	+						
Спящие почки	-	-	-							-	-	-

Из данных таблицы 2. видно, что применение метода ИФА возможно только в первой половине астрономического года с применением описанных выше тканей плодовых растений и применения трехстадийного ИФА с рекомендуемыми разведениями иммуноглобулинов, конъюгата и растительного сока, а также режимов инкубирования.

4.2. Усовершенствование и оптимизация метода иммуносорбентной электронной микроскопии (ИСЭМ) для диагностики ВЯДЯ

Основой наших исследований послужила методика специфического вылавливания вирусных частиц методом иммуносорбентной электронной микроскопии.

Завершив серию экспериментов по оптимизации метода ИСЭМ с использованием тканей зараженных индикаторов, мы начали препарирование этого вируса непосредственно из тканей пораженных растений плодовых культур. Препараты готовили с использованием буферной смеси с добавками, которую применяли при препарировании исследуемого вируса в сыром соке травянистых индикаторов. Использование такой смеси позволило надежно выявлять частицы вируса ямчатости древесины яблони в экстрактах из тканей искусственно пробуждённых почек, лепестков цветков в большом количестве, черешков и листьев, активно растущих побегов, плодов и коры одно - двухлетних побегов в течение года (рис. 8). В дальнейшем при диагностике вируса ямчатости древесины яблони методом ИСЭМ в качестве экстрагирующего буфера использовали 0,05М Na/K-фосфатный буфер pH-7,2-7,8 с добавлением 0,01% сульфита натрия и аскорбиновой кислоты. На основании результатов проведённых исследований идентификацию вируса ямчатости древесины яблони методом ИСЭМ предлагаем проводить по следующей схеме:

- разведение антисыворотки 0,01М Na/K-фосфатным буфером pH-7,2-7,4;
- покрытие препаративных сеток разведенной антисывороткой и инкубирование при $t+37^{\circ}\text{C}$ во влажной камере в течение 30 мин;
- промывка препаратов тремя каплями 0,01М Na/K-фосфатного буфера pH-7,2-7,4;
- перенос сеток на растительный экстракт и инкубация в течение 30 минут при тех же условиях (гомогенизацию растительной ткани проводить с использованием 0,05М Na/K-фосфатного буфера pH-7,2-7,8 с добавлением 0,01-0,02% сульфита натрия и аскорбиновой кислоты);
- промывка препаратов 0,01М Na/K-фосфатным буфером pH-7,2-7,4 и инкубация на сыворотке того же разведения в течение 30 минут при тех же условиях;
- промывка препарата 6-8-ю каплями дистиллированной воды и контрастирование 2-3% водным раствором уранилацетата и визуализация препаратов в электронном микроскопе.

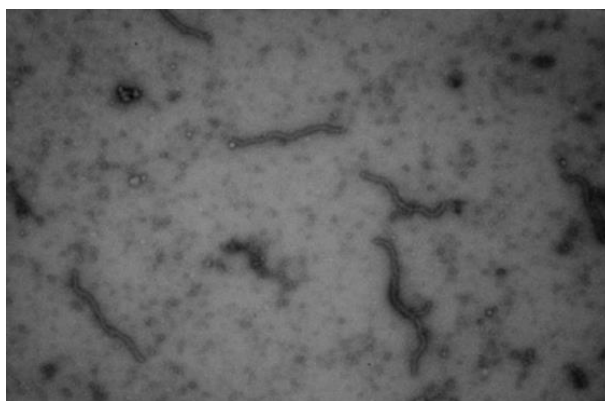


Рис. 8. Электронная микроскопия частиц ВЯДЯ в препарате из сырого сока зараженной яблони x18000

Усовершенствованная и оптимизированная нами методика широко применялась при отборе здоровых клонов, кандидатов в безвирусные клоны, а также в работах по тестированию безвирусных образцов плодовых культур в маточниках категории «Пребаза», «База», и «Сертификат».

На основании полученных результатов нами составлен календарный план тестирования вируса ямчатости древесины яблони в системе производства безвирусного посадочного материала. Тестирование исходных клонов и ретестирование подвойно-привойных маточников предлагаем проводить в следующие календарные сроки (таб.3.).

Таблица 3. Календарные сроки диагностика ВЯДЯ методом ИСЭМ

Исследуемые органы растения	Месяцы тестирования											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Листья активно растущих побегов					+	+	+					
Лепестки				+	+							
Кора 1-2 летних побегов	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Плоды							+	+	+			

Как видно из данных таблицы 3, идентификацию вируса ямчатости древесины яблони методом ИЭМ по коре одно-двулетних побегов можно проводить в течение всего астрономического года. По листьям активно растущих побегов тестирование можно проводить с мая по июль месяц, по лепесткам в апреле-мае, а по плодам тестирование можно проводить с июля по сентябрь.

4.3. Оптимизация метода полимеразной цепной реакции для диагностики ВЯДЯ

Используя коммерческий набор для выделения тотальной РНК фирмы Qiagen (GB), мы провели выделение тотальной РНК из растительного материала, а именно из заражённых вирусом ЯДЯ листьев *Nicotiana occidentalis 37B* и плодов *Virginia crab*. Полученные нами результаты не были пригодны для дальнейшей работы по проведению ОТ-ПЦР из-за низкой концентрации выделенной тотальной РНК. Поэтому при дальнейшем выделении тотальной РНК применили жидкий азот на стадии гомогенизации растительных образцов, что позволило нам увеличить количество выделяемой РНК и ее использование в дальнейших работах по проведению ОТ-ПЦР (рис 9), [6].

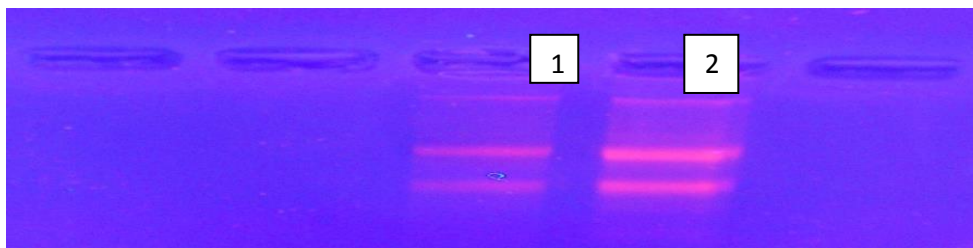


Рис. 9. Выделение РНК из образцов с применением жидкого азота.

1-*Nicotiana occidentalis* 37B, 2-*Virginia crab*.

После выделения тотальной РНК мы провели ОТ-ПЦР с применением праймеров, рекомендованных фирмой - производителем диагностического набора.

Визуализацию результатов ОТ-ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Результаты ОТ-ПЦР отражены на рисунке 10.

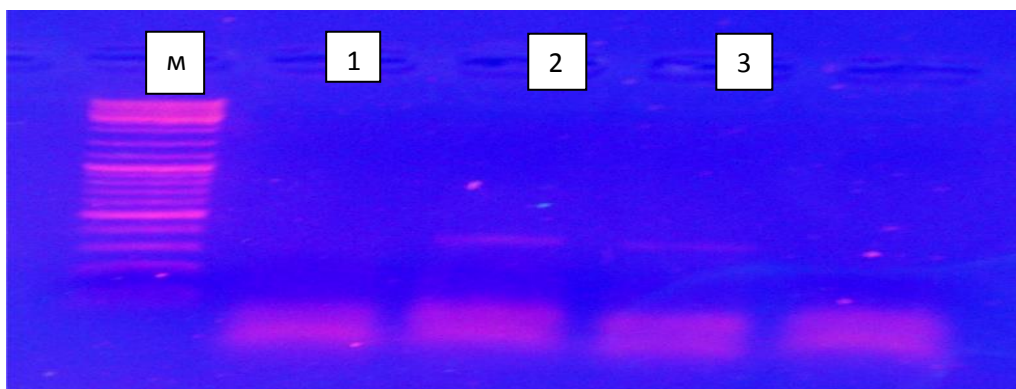


Рис. 10. Результаты ОТ-ПЦР молдавских изолятов ВЯДЯ.

Как видно из рисунка 10, образцы 2–3 показали положительные результаты.

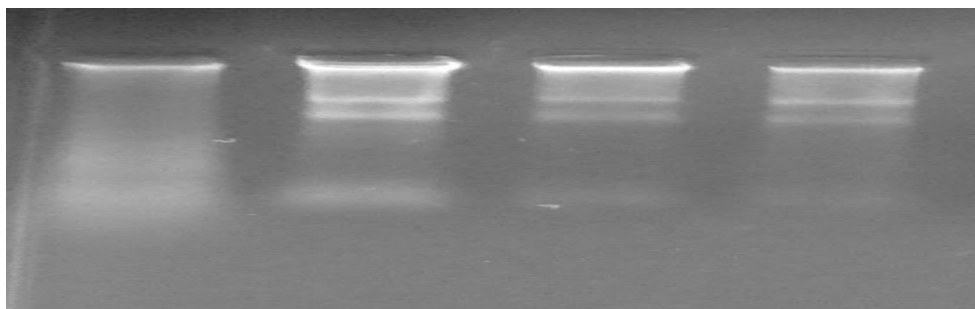
После получения нами антисыворотки к ВЯДЯ было решено провести выделение антигена (вируса) из растительного материала методом «Immunocapture» для дальнейшего использования в проведении ОТ-ПЦР.

Результаты выделения антигена из образцов методом «immunocapture» представлены на (рис. 11). Как видно на рис. 11, вирус ямчатости древесины яблони отсутствует только в образце 1.

Полученные результаты после «immunocapture» мы использовали для проведения ОТ-ПЦР с применением праймеров.

5' – ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA - 3' (8869-8895).

5' - TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA – 3' (9211-9238).



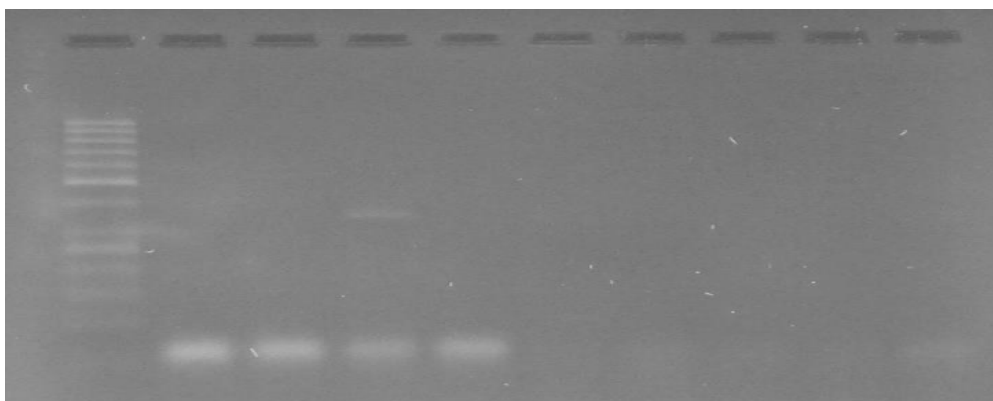
1 2 3 4

Рис. 11. Выделение антигена из образцов с применением метода «immunocapture».

1-10/21 Ренет Симиренко; 2-*Virginia crab*;

3-3/53/20 *Nicotiana occidentalis* 37B; 4-Morton4/6;

Результаты электрофореза представлены на рисунке 12.



М 1 2 3 4

Рис. 12. Результаты ОТ-ПЦР с применением метода «immunocapture».

Наш фрагмент 370 п.о. в дорожке №3 и является образцом 3/53/20 ВЯДЯ, выделенным из *Nicotiana occidentalis* 37B.

Таким образом, использование метода «immunocapture» показало, что для проведения качественной реакции ПЦР не обязательно использовать кит для выделения тотальной РНК.

Расчёт экономической эффективности применения метода «Immunocapture»

Нами был проведен расчёт экономической эффективности проведения выделения антигена с применением метода «Immunocapture». Данные стоимости наборов взяты у коммерческих фирм - производителей Bioreba и Qiagen.

Так, набор для выделения тотальной РНК фирмы Qiagen RNeasy Mini Kit на 50 выделений стоит 285,72 \$ США. (13.09.2015). Курс доллара по отношению к лею составляет 19.54 лея за 1 доллар.

Отношение курсов валют составляет 21.56/19.54 и равняется 1.103.

Таким образом, 285.72\$ США равняется 259.03 Евро.

Стоимость одного выделения составляет 5.18 Евро или 111.68 лей.

Стоимость сета IgG на 500 выделений составляет 113 Евро (13.09.2015). Курс евро по отношению к Молдавскому лею составляет 21.56 лей за 1 евро.

Стоимость одного выделения составляет 0,226 Евро или 4.87лей.

Исходя из представленных данных, экономическая эффективность применения метода immunocapture составляет разницу в 22.9 раза. Таким образом, выделение антигена с применением метода immunocapture в 22.9 раза дешевле, чем выделение тотальной РНК с применением коммерческих наборов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Общие выводы

1. Выявлены и идентифицированы вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони для определения реакции переноса на травянистые индикаторы, накопления вирусных частиц, очистки и использования в дальнейших работах.
2. Получен очищенный препарат вируса ямчатости древесины яблони и приготовлены высокоспецифичные антисыворотки с активностью антител при разведении 1:1800 - 1:2048.
3. Оптимизирована диагностика ВЯДЯ методом иммуноферментного анализа. Для практических целей рекомендован «сэндвич» – вариант иммуноферментного анализа со следующими режимами проведения: а) инкубирование иммуноглобулинов 3 часа при t^0+37^0C ; б) инкубирование тестируемых образцов 3 часа при t^0+37^0C ; в) инкубирование конъюгата 3 часа при t^0+37^0C .
4. Установлено, что оптимальным для достоверного обнаружения вируса ямчатости древесины яблони является разведение иммуноглобулинов в соотношении 1:1000; разведение конъюгата 1:750 и разведение растительного экстракта плодовых растений 1:10.
5. Усовершенствован и предложен метод диагностики вируса ямчатости древесины яблони методом иммуносорбентной электронной микроскопии, подобраны условия

и календарные сроки тестирования вируса ямчатости древесины яблони данным методом.

6. Оптимизирован метод полимеразной цепной реакции для диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Впервые в Молдове отработан метод «immunocapture» для выделения нуклеопротеида из растительного экстракта, что позволило существенно повысить рентабельность метода.
7. Определена экономическая эффективность применения метода «immunocapture» с применением антисыворотки собственного производства, что удешевляет выделение нуклеопротеида в 22.9 раза.
8. Разработанные, усовершенствованные и оптимизированные методы диагностики ВЯДЯ применены в системе сертификации посадочного материала семечковых культур в Республике Молдова.

Практические рекомендации

1. Произведённая высокоспецифичная антисыворотка к вирусу ямчатости древесины яблони и приготовленный на её основе диагностический набор рекомендованы для применения в плодовом питомниководстве при получении исходных клонов, тестировании и ретестировании маточных насаждений, а также при контроле фитосанитарного состояния производимых саженцев яблони, согласно системе сертификации посадочного материала, принятой в Республике Молдова.
2. Рекомендованы для диагностики вируса ямчатости древесины яблони два иммунологических метода диагностики ИФА и ИСЭМ. Рекомендованы календарные сроки их применения для диагностики вируса ямчатости древесины яблони с использованием органов и тканей растения.
3. Впервые в Молдове оптимизирован и рекомендован для использования в работах по получению безвирусных клонов и тестирования вируса ямчатости древесины яблони молекулярно-генетический метод ОТ-ПЦР.
4. Рекомендовано проведение выделения нуклеопротеида из экстракта методом «immunocapture». Данный метод ОТ-ПЦР будет использоваться при тестировании исходных безвирусных клонов. Применение оптимизированных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони позволит ускорить процесс перевода плодового питомниководства Республики Молдова на безвирусную основу.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Calășean I. ș. a. Pepinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. În: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, Chișinău, 2012, nr 2, p. 9-10.
2. Hotărîrea Guvernului nr. 415 din 21.06.2013. Pentru aprobarea Normei privind producerea, controlul, certificarea și comercializarea materialului de înmulțire și de plantare fructifer. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 28.06.2013, nr. 136-139.
3. Legea Republicii Moldova cu privire la pomicultură Nr.728-XIII din 06.02.96. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 21.03.1996, nr.17-18/188.
4. Калашян Ю. и др. Создание и содержание безвирусного генофонда семечковых пород в Республике Молдова. В: Материалы VII Международной конференции по теме: «Биоресурсы и вирусы», Киев, (Украина), 2013, с. 73.
5. Калашян Ю. и др. Фитосанитарный контроль в системе сертификации плодового питомниководства. В: Protectia plantelor, realizari si perspective, Chisinau, 2004, p.78-79.
6. Проданюк Л.Н. Диагностика вируса ямчатости древесины яблони методом полимеразно-цепной реакции. В: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, 2015, nr.5-6, p.42-43.
7. Проданюк Л.Н. и др. Оценка зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами в коллекции Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий. В: Плодоводство и ягодоводство России, 2013, Том XXXVI, часть 2, с. 110-111.
8. Certification scheme. Virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. Part III: testing methods for viruses of fruit trees present in the EPPO region. In: EPPO Bulletin, 1992, nr. 22, p. 265-277.
9. EPPO certification scheme for fruit trees, including almond. In: Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 06/2008, vol. 27(4), p. 571 - 579.
10. Van der Meer F.A. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. In: Akta Horticulturae, 1986, nr. 193, p. 73-74.
11. Yanase H. A. and Koganezawa H. New Type of Elongated Virus Isolated from Apple Trees Containing the Stem Pitting Agent. In: Plant Dis, 1990, nr. 74, p. 610-614.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

Статьи в журналах национального значения, категория С:

1. Calășean I., Cernets A., Zemcic E., Luchița V., Covalenco G., Prodaniuc L., Colibaba N., Calășean N. Pepinierit Pomicol doar în baza Materialului devirozat. Pomicultura, Viticultura și Vinificația, Chișinău, 2012, nr. 2, p.9-10. ISSN 1857-3142.

2. Проданюк Л.Н. Обследование коллекции яблони Научно-Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий на наличие вируса ямчатости древесины яблони. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, 2014, nr. 3. ISSN 1857-3142.
3. Проданюк Л.Н. Диагностика вируса ямчатости древесины яблони методом полимеразно-цепной реакции. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, 2015, nr. 5-6, p. 42-43. ISSN 1857-3142.

Статьи в Международных изданиях:

4. Kalashyan Yu., Chernets A., Lukitsa V., Prodaniuc L., Kalashyan N. The Cherry Leaf Roll Virus (CLRV) on Walnut in the Republic of Moldova. *ВІСНИК Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 2011, nr.59, с. 14-15. ISSN 1728-3817.
5. Калашян Ю., Чернец А., Лукица В., Проданюк Л., Калашян Н., Полищук В., Будзанивская И. Вирус ямчатости древесины яблони в Молдове. *Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко*, 2012, nr. 62, с. 61-64. ISSN 1728-3817
6. Проданюк Л.Н., Калашян Ю.А., Чернец А.М., Букарчук В.Ф., Лукица В.И. Оценка зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами в коллекции Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий. *Плодоводство и ягодоводство России*, 2013, Том XXXVI, ч. 2, с. 110-111. ISSN: 2073-4948
7. Калашян Ю., Чернец А., Лукица В., Проданюк Л. Создание и содержание безвирусного генофонда семечковых пород в Республике Молдова. *Материалы VII Международной конференции по теме: «Биоресурсы и вирусы»*, Киев, (Украина), 2013, p.73.
8. Kalashyan Yu., Chernets A., Zemchic E., Lukitsa V., Prodaniuc L., Kovalenko G., Kalashyan N., Gendov N. The phytosanitary certification system of the fruit tree nurseries in Moldova. *Information bulletin IOBS EPRS*, 2014, nr. 46, p. 54-56.
9. Kalashyan Yu., Chernets A., Lukitsa V., Prodaniuc L., Juraveli A. Plum hybrids susceptibility to sharka in the conditions of Moldova. *The X international Congress of Geneticists and Breeders. Republic of Moldova, Chisinau*, 2015, p. 84. ISBN 978-9975-933-56-8.

Материалы и абстракты научных сообщений:

10. Калашян Ю., Чернец А., Магер М., Проданюк Л. Фитосанитарный контроль в системе сертификации плодового питомниководства. *Protectia plantelor, realizari si perspective*, Chisinau, 2004, p.78-79.
11. Калашян Ю., Чернец А., Лукица В., Проданюк Л., Журавель А. Предварительные результаты селекции сливы на устойчивость к вирусу шарки. *Информационный бюллетень ВПРС МОББ*, nr. 41, Кишинев, 2012, с. 454-457.

ADNOTARE

Prodaniuc Leonid –«Diagnosticul virusului strierii lemnului mărului în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol», teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2016.

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 164 titluri, 25 de desene, 12 tabele, 16 anexe, 100 de pagini de text de bază. Rezultatele obținute sunt publicate în 11 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: virus, strierea, măr, optimizarea, metode, specii semincere, testare, certificare.

Domeniul de studiu: Protecția plantelor.

Scopul tezei: Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului, și aplicarea lor în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol de specii semincere, conform standardelor europene de certificare.

Obiectivele cercetării: depistarea și identificarea tulpinilor virulente a virusului strierii lemnului mărului. Determinarea reacției indicatorilor erbacei la transferul virusului strierii lemnului mărului pe ei. Optimizarea metodicii de purificare a acestui virus. Obținerea antiserului diagnostic către virusul strierii lemnului mărului. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului strierii lemnului mărului. Implementarea metodelor optimizate de diagnosticare în sistemul de certificare a materialului săditor pomicol de specii semincere.

Noutatea științifică: Pentru prima dată în Moldova a obținut un antiser cu specificitate înaltă cu capacitatea de a depista VSLM prin metoda analizei imunoenzimatică. Sa optimizat metoda reacției în lanț a polimerazei pentru diagnosticarea VSLM, în baza anticorpilor diagnostici obținuți sa efectuat metoda “immunocapturare” sau determinat termenii calendaristici de depistare a VSLM.

Problema științifică soluționată constă în argumentarea științifică a procedurilor metodologice, axate spre perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare a virusului SLM în sistemul de producere a materialului săditor devirozat. În baza rezultatelor studierii specificității antiserelor obținute, perfecționării metodelor optimizate și determinării termenilor calendaristici pentru efectuarea testării virusului SLM, sau elaborate, perfecționat și aplicat metodele optimizate în sistemul de certificare a materialului săditor devirozat de specii semincere.

Importanța teoretică a lucrării constă în elaborarea și perfecționarea metodelor, sigure de diagnosticare a virusului SLM pentru testarea și retestarea materialului săditor pomicol ceea ce va fi la baza teoretică, a metodelor expres de testare a altor două, viroze latente a mărului. Perfecționarea și optimizarea metodelor de diagnosticare va permite de a rezolva un șir de sarcini teoretice și practice pentru transferul pepinieritului pomicol la normele internaționale de certificare.

Valoarea aplicativă a cercetărilor: Datele experimentale obținute permit a recomanda utilizarea metodelor optimizate în lucrările pentru obținerea clonelor devirozate cu scopul transferului pepinieritului Republicii Moldova în baza materialului devirozat și normelor internaționale de certificare.

Implementarea rezultatelor științifice: au fost implementate în Laboratorul de virusologie al IȘPHTA, unde sunt utilizate pe larg la lucrările pentru obținerea clonelor devirozate, și în gospodăriile republicii SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GTJ „Melnic Ioana Feodor”, GTJ „Cebotari Feodor Mihail”, GTJ „Ghilinschii Dumitru” în pepinierele speciilor semincere.

АННОТАЦИЯ

Проданюк Леонид. «Диагностика вируса ямчатости древесины яблони в системе сертификации посадочного материала плодовых культур», диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук, Кишинёв, 2016.

Структура диссертации. Введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, 100 страницах основного текста, 164 библиографических источника, 25 рисунков, 12 таблиц и 16 приложений. Результаты опубликованы в 11 научных работах.

Ключевые слова: вирус, ямчатость, яблоня, оптимизация, методы, семечковые породы, тестирование, сертификация.

Область исследований. Защита растений.

Цель работы. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони и применить их в системе сертификации плодового посадочного материала семечковых культур, согласно европейским стандартам сертификации.

Задачи исследований. Выявить и идентифицировать вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони. Определить реакцию на перенос вируса ямчатости древесины яблони на травянистые индикаторы. Оптимизировать методику очистки вируса ямчатости древесины яблони. Разработать диагностическую антисыворотку к вирусу ямчатости древесины яблони. Усовершенствовать и оптимизировать методы диагностики вируса ямчатости древесины яблони. Внедрить оптимизированные методы диагностики в систему сертификации плодового посадочного материала семечковых культур.

Новизна исследований. Впервые в Молдове приготовлена высокоспецифичная антисыворотка, способная выявлять вирус ЯДЯ методом ИФА. Оптимизирован метод ПЦР для диагностики вируса ЯДЯ, на базе приготовленных диагностических антител проведён метод «Immunocapture», разработаны календарные сроки выявления вируса ЯДЯ.

Решенная важная научная проблема *состоит в научном обосновании методологических подходов, направленных на усовершенствование и оптимизацию методов диагностики ВЯДЯ в системе производства безвирусного посадочного материала.* На основании результатов исследований специфичности полученных антисывороток, усовершенствования оптимизированных методов и определения календарных сроков проведения тестирования ВЯДЯ, *что позволило разработать, усовершенствовать и применить оптимизированные методы в системе сертификации безвирусного посадочного материала семечковых культур.*

Теоретическое значение работы состоит в разработке и усовершенствовании надёжных методов диагностики вируса ямчатости древесины яблони, для тестирования и ретестирования плодового посадочного материала, что послужит в качестве теоретической основы экспресс методов тестирования двух других латентных вирусов яблони. Усовершенствование и оптимизация методов диагностики позволит решить ряд теоретических и практических задач по переводу плодового питомниководства на международные нормы сертификации.

Практическая значимость: полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать применение оптимизированных методов в работах по получению безвирусных клонов с целью перевода питомниководства республики на безвирусную основу и международные нормы сертификации.

Внедрение научных результатов: внедрены в лаборатории вирусологии НПИСВиПТ и широко применяются в работах по получению безвирусных клонов, и в хозяйствах республики: SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” в питомниках семечковых культур.

ABSTRACT

Prodaniuc Leonid. “Diagnostics of the Apple stem pitting virus in the certification system of the fruit planting material “

Thesis for the degree of Doctor in Biological Sciences, Chisinau, 2016, consists of the introduction, four chapters, the main conclusions and recommendations, bibliography of 164 sources. The work is presented on 100 pages of the main text; it contains 12 tables, 25 figures and 16 supplements. The results within the dissertation were published in 11 scientific articles.

Key words: virus, pitting, apple, optimization, methods, fruit seed species, testing, certification

Domain of research: Plant protection.

Aim of research: To improve and optimize the diagnostics methods of the Apple stem pitting virus and apply them in the system of fruit seed planting material certification according to the European certification standards.

Objectives: Isolation and identification of the virulent strains of the apple stem pitting virus. Determination of the reaction on the apple stem pitting virus transmission to the herbal indicators. Optimization of the apple stem pitting virus purification method. Elaboration of the diagnostic antiserum for the apple stem pitting virus. Improving and optimization the apple stem pitting virus diagnostic methods. Implementation of the optimized diagnostic methods in the system of certification of fruit seed planting material.

Scientific originality. For the first time in the Republic of Moldova the highly specified antiserum, which is capable to determine ASPV using ELISA method, is prepared. The PCR method for ASPV diagnostics is optimized. The method «Immunocapture», based on the obtained diagnostic antibodies is carried out. The calendar dates for the ASPV determining are elaborated.

The important solved scientific problem consists in the scientific substantiation of methodological approaches of the elaboration and optimization of the ASPV diagnostics methods in the system of production of the virus-free planting material. The results of the study of the obtained antisera specificity, the implementing of the optimized methods and the determination of the calendar terms of the testing for the ASPV presence allowed to elaborate, improve and apply the optimized methods in the system of the fruit seed species virus-free planting material certification.

The theoretical significance consists in the elaborating and improving of the reliable methods of the apple stem pitting virus diagnostics, testing and re-testing of the fruit planting material, which serve as a theoretical basis for rapid testing methods of the other two latent apple viruses. Improvement and optimization of diagnostic methods will allow solving a number of theoretical and practical problems of transferring fruit nursery on the international certification standards.

The practical significance of the work. The obtained experimental data allow recommending the utilization of the optimized methods for getting the virus-free clones in order to transfer the Republic's nursery on the virus free basis and the international certification standards.

Implementation of scientific results: the obtained results are implemented in the Laboratory of Virology (PSIHFP) and are widely used in the virus-free clones obtaining and in the farmers SRL „Surinmih”, SRL „GelnacrAgro”, GT „Melnic Ioana Feodor”, GT „Cebotari Feodor Mihail”, GT „Ghilinschii Dumitru” and in the fruit seed species nurseries.

ПРОДАНЮК ЛЕОНИД

**ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ
ЯБЛОНИ В СИСТЕМЕ СЕРТИФИКАЦИИ ПОСАДОЧНОГО
МАТЕРИАЛА ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР**

411.09 – ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени доктора биологических наук

Aprobat spre tipar: data

Formatul hîrtiei 60x84 1/16

Hîrtie offset. Tipar offset.

Tiraj 50 ex.

Coli de tipar.: 1,8

Comanda nr.
