

- № 14 (2). – Шифр Информрегистра: 0421200126/0022. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/12/02/09.pdf>
2. Дементьева, М. И. Болезни плодовых культур. М., Сельхозиздат, 1962. – 240 с.
 3. Кирай, З. Методы фитопатологии / З. Кирай, З. Клемент, Ф. Шоймоши, Й. Вереш. – М.: Колос, 1974. – 344 с.
 4. Ланак, Я. Атлас болезней и вредителей плодовых, ягодных, овощных культур и винограда / Я. Ланак, К. Шимко, Г. Ванек. – Братислава: Природа, 1972. – 58 с.]
 5. Методы изучения бактериальных болезней растений : методические указания для научно-исследовательской работы студентов. – Москва: Издательство МСХА, 1989. – 26 с.
 6. Стороженко, Е. М. Болезни плодовых культур и винограда / Е. М. Стороженко. – Краснодарское книжное издательство, 1970. – 84 с.

УДК 632.35:634.10(476)

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОРНЕВОГО РАКА ПЛОДОВЫХ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР (AGROBACTERIUM TUMEFACIENS)

Кизелевич Н. Ю., Брукиш Д. А.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

Заболевания, вызываемые фитопатогенными бактериями, снижают урожайность, ухудшают качество продукции, способствуют преждевременной гибели растений [1]. По этой причине актуальной задачей становится их идентификация, чтобы иметь возможность предложить необходимые мероприятия по защите культур.

Применяемые в бактериологии классические методы идентификации бактерий требуют больших затрат на дорогостоящие дифференциально-диагностические среды, реактивы, посуду, что делает проводимые исследования не всегда окупаемыми. К тому же они сопряжены с длительными сроками (до 20 дней) [3]. Поэтому перед нами стояла цель найти наиболее перспективный метод идентификации изучаемой нами бактерии (*Agrobacterium tumefaciens*).

Существует много различных методов и их модификаций по идентификации возбудителей бактериальных болезней: визуальный, микробиологический, ферментативные тесты; иммунофлуоресцентная микроскопия (ИФМ), иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако в последнее время все большую роль в диагностике фитопатогенов играет метод ПЦР, который приобрел широкое распространение благодаря относительной простоте, чувствительности и высокой специфичности. В случае анализа методом

ПЦРа для детекции достаточно около 10 копий ДНК или кДНК целевого гена. Этот метод позволяет идентифицировать любой вид по специфической нуклеотидной последовательности его генома и является наиболее точным и чувствительным диагностическим методом, позволяющим быстро выявлять бактерии, вызывающие бактериальный корневой рак плодовых семечковых культур [2, 3, 4].

Подготовка бактериальной культуры к идентификации методом ПЦР. Пять граммов образцов почвы добавляют к 30 мл стерильной дистиллированной воды в химических стаканах емкостью 100 мл и встряхивают в течение 30 минут при 70 оборотах в минуту. Допускается оставить образцы на 10 минут для полного осаждения осадка. Затем 50 мкм надосадочной жидкости инокулируют на подготовленную питательную среду. Культура выдерживается при 28°C в течение 5-7 дней до появления колоний.

Для корневых образцов 3 грамма ткани измельчают с помощью ступки и пестика и затем прodelьвают ту же самую процедуру, что и с почвенными образцами.

ПЦР-диагностику колоний проводят следующим образом: одну выбранную колонию добавляют к 100 мкл стерильной дистиллированной воды, кипятят в течение 5 мин и 5 мкл супернатанта используют в качестве ДНК-матриц. Реакционный раствор содержит 4 мкл ДНК-матриц, реакционные смеси (25 мкл), включающие праймеры олигонуклеотидов по 10 пмоль (пикомоль) в каждом, 200 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в каждом, 1 U термостабильной ДНК-полимеразы (hylabs), реакционный коктейль, поставляемый производителем (в данном случае на примере Perkin-Elmer содержащий 10 мМ Трис-основания [рН 8,3 при 258°C], 50 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl₂; 0,001% желатина [Sigma G2500] и Epicenter включающий 50 мМ Трис-буфера [рН 9,0 при 258°C], 20 мМ сульфата аммония, 1,5 мМ MgCl₂). ПЦР начинается посредством денатурации при 94°C в течение 5 минут, затем отжига при 50°C в течение 1 мин и удлинение при 72°C в течение 1 минуты и конечным удлинением при 72°C в течение 10 минут. Эту процедуру повторяют 35 циклов. ПЦР-продукты разделяются с помощью электрофореза на 2% агарозном геле и визуализируются под ультрафиолетовым светом после прокрашивания в растворе бромистого этидия.

В результате проведенного анализа для постановки полимеразной цепной реакции предлагается использовать универсальные праймеры для обнаружения Agrobacterium. Последовательность смысловой нити праймера следующая: 59-GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT-39 (координаты 8867 в 8884 в ссылке 3), последовательность антисмыс-

ловой цепи праймера, СУТ9 – 59-GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT-39 (координаты 9293 в 9276 в ссылке 3). Эта пара праймеров дает 427 п.о. (пар оснований). Процедура ПЦР позволяет дифференцировать между патогенными и непатогенными *Agrobacterium* [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурдинская, В. Ф. Бактериозы виноградной лозы / В. Ф. Бурдинская, Н. О. Арестова // Защита и карантин растений : ежемесечный журнал для специалистов, ученых и практиков. – 2010. – №6. – С. 49-52.
2. Завриев, С. К. Эффективный и экономичный метод чувствительной диагностики и идентификации патогенов картофеля / С. К. Завриев, Д. Ю. Рязанцев, Т. Е. Кошкина, Д. Д. Абрамов // Картофельводство России: актуальные проблемы науки и практики. М.: ФГНУ: «Росинформагротех», 2007. – С. 100-103.
3. Морозкина, Е. В. Бактериальные болезни картофеля в Беларуси / Е. В. Морозкина, И. И. Бусько, Д. А. Ильяшенко // Земляробства і аховараслін. – 2011. – № 5. – С. 30-34.
4. Скурат, Э. К. Экспресс-методы диагностики бактериальных болезней у рыб / Э. К. Скурат, В. А. Сиволоцкая, Р. Л. Асадчая // Ученые записки УО «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». Т. 39. Ч. 2. – Витебск, 2003. – С. 101-103.
5. Jerry, H. H. M. Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains / H. H. Jerry, W. M. Larry, R. Walt and Shula // Applied and Environmental Microbiology 1995. – № 61(8). – P. 2879-2884.

УДК 635.262:632.952 (476)

ДЕЙСТВИЕ ФУНГИЦИДА ИНШУР ПЕРФОРМ НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНИЛЕЙ ЧЕСНОКА

Матиевская Н. А., Брукиш Д. А.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

В последние годы в Республике Беларусь расширилось производство чеснока, однако население все еще недостаточно обеспечено им. Одной из причин этого являются потери при хранении, которые достигают больших размеров – 20-30% (Ширко Т.С., Харитоновна А.П., Косенок В.Н., 1981). Наукой и передовой практикой установлено, что на сохранность чеснока оказывает влияние ряд факторов. Однако в производственных условиях большая часть потерь при хранении связана с поражением болезнями. Объясняются потери в значительной степени недостаточной научной разработкой способов борьбы с болезнями применительно к современным промышленным способам производства и хранения (Дьяченко В.С., 1985).

На сегодняшний день в условиях ежегодного расширения посадок чеснока актуальными являются вопросы по снижению патогенного