

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСНИХ І ФІТОПЛАЗМОВИХ ХВОРОБ ВИНОГРАДУ МЕТОДАМИ ПЛР І ІФА

Сорти винограду, що ростуть в Україні, досліджували на зараженість вірусними і фітоплазмовими інфекціями за допомогою методів полімеразної ланцюгової реакції і імуноферментного аналізу. Встановлено, що інфікованими вірусними і фітоплазмовими інфекціями виявився не тільки рядовий садивний матеріал, але і сертифіковані клони винограду імпортного походження.

Ключові слова: вірус коротковузля винограду, вірус скручування листя винограду, фітоплазмова інфекція, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз, виноград

Тестування винограду в лабораторних умовах дуже важливе, тому що дозволяє уникнути розповсюдження хвороб на нові виноградники. За останні роки виявлення вірусних хвороб винограду супроводжувалось трудомісткими і повільними за строками біологічними тестами [1]. Сьогодні більшість небезпечних вірусних хвороб винограду можна виявити швидкими лабораторними тестами. В деяких випадках при захворюванні винограду проявляються характерні симптоми, які можна легко ідентифікувати в польових умовах, однак найчастіше зустрічаються симптоми, які можуть бути викликані рядом причин, у тому числі і фізіологічні відхилення [2]. У більшості для вірусних хвороб характерні симптоми проявляються тільки в визначенні пори року, так при вірусній хворобі скручуванні листя - почервоніння листя на червоних сортах проявляється в кінці літа або восени [3]. Дослідження таких кущів навесні дозволяє визначити статус захворювання. В період спокою неможливо виявити в польових умовах симптоми вірусної інфекції. Крім того, виноград, уражений цілим рядом вірусів може не проявляти ніяких симптомів інфекції. Така латентна ураженість може бути виявлена тільки в результаті лабораторного тестування.

Останнім часом на виноградниках України проявилася дуже небезпечна хвороба, що викликається фітоплазмою. Ця хвороба також поширена в Італії, Франції, Югославії, Німеччині, а на території СНД до 2004 року не реєструвалася. Збитки від цієї хвороби дуже значні.

Найбільш шкодочинними та поширеними серед хвороб, що викликаються фітоплазмами в країнах Європи є золотисте пожовтіння винограду [4] та почорніння деревини винограду [5]. Ці дві хвороби за симптоматикою дуже схожі, ідентифікацію їх можна провести тільки лабораторними молекулярно-діагностичними методами [4, 5, 6,7].

У 2004 році вона була виявлена на території Одеської області на сорті Шардоне [8]. Це найбільш чутливий сорт до збудника фітоплазмової інфекції. Була проведена ідентифікація цієї інфекції, та встановлено, що ця хвороба є почорніння деревини і відноситься до групи стовбуру.

Діагностика цих небезпечних хвороб є важливою задачею для запобігання їх розповсюдження. Наші дослідження були спрямовані на розробку швидких і надійних методів діагностики цих хвороб.

Значимість вирішення цих проблем і зумовила актуальність цих досліджень.

Метою даної роботи було дослідження деяких сортів винограду імпортного походження на наявність вірусних і фітоплазмових хвороб винограду.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для проведення дослідження були саджанці сорту Каберне Совінйон і сорту Шардоне, виробництва Словенія, Німеччина і Франція і Молдова.

Для проведення лабораторної діагностики латентного ураження вірусними хворобами відбирали один саджанець винограду з кожної сотні дослідженої партії.

Виявлення вірусних антигенів проводили методами імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням тест-систем фірми "AgriTest" (Італія) та за допомогою полімеразної ланцюгової

реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Виділення вірусів проводили у здерев'янілих пагонах. Зразки для проведення ПЛР готували згідно Rowhani et al. [9]. Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила дейонізовану воду, 10X ПЛР буфера (500 мМ КСl, 100 мМ Трис-НСl, рН 9,0), сахарозу (20 %) і крезоловий червоний, 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), 0,1 М дитіотриетолу (ДТТ), 10 пмоль кожного праймера, 1,25 Од Таq-полімерази («АмплиСенс», Росія), 8 Од ревертази («АмплиСенс», Росія), 1,5 мМ MgSO₄ [1]. Використовували наступні пари праймерів: CPV і CPC (GLRaV-1), С 547 і Н 229 (GLRaV-3), oligoC1 і oligoV1 (GFLV) [3]. У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка. В якості позитивного контролю використовували інфікований вірусами коротковузля і скручування листя матеріал винограду, люб'язно наданий доктором D. Boscia (Барійський університет, Італія). В якості негативного контролю використовували дейонізовану воду.

Зворотною транскрипцію проводили у термостаті при 52 °С протягом 30 хвилин. Ампліфікація включала 35 циклів (94 °С – 30 сек, 56 °С – 45 сек, 72 °С – 60 сек), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хвилин. Для GLRaV-1 в ході дослідження температура відпалу була 52 °С, а для GFLV - 60 °С.

Реакцію проводили у програмувальному термостаті „Терцик” фірми “ДНК – Технологія” (Росія). Електрофорез проводили в 1,5 % агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-боратного буфера для електрофорезу („АмплиСенс”, Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми „Mintron” в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркер молекулярної ваги 800 – 200 пар основ нуклеотидів („АмплиСенс”, Росія).

Для діагностики фітоплазмової інфекції виділення ДНК із здерев'ялих чубуків проводили за методикою N. Nabili. Для цього брали зіскріб кортикального шару чубука 0,2 г, гомогенізували з 0,02 г метабісульфіта натрію і 2 мл екстракційного буфера. В епендорф об'ємом 1,5 мл додавали 60 мкл 20 % саркозилу, інкубували при 65 °С 30 хвилин у термостаті, після чого додавали 0,6 мл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт, струшували й завислі частки вилучали центрифугуванням при 12000 об/хв. Переносили 0,65 мл водної фракції в новий епендорф, додавали 0,4 мл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт, добре струшували й центрифугували 10 хвилин при 14000 об/хв. Промивали осад 0,6 мл холодним 76 % етанолом, який містив 100 мМ ацетата амонію. Добре висушували осад від етанолу й суспендували в 200 мкл ТЕ-буфера рН 8,0. Після чого додавали 0,5 мл холодного 100 % етанолу й 3 мкл 3 М ацетата натрію рН 4,6-5,2; струшували і залишали на льоду 10 хвилин. Центрифугували при 4 °С 15 хвилин при 14000 об/хв. Промивали осад 1 мл холодного 70 % етанолу, добре висушували від етанолу й суспендували осад у 50 мкл ТЕ-буфера. Виділену ДНК діагностували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

ПЛР ампліфікацію проводили з універсальною парою праймерів до різних ділянок геному, специфічною для фітоплазм fU5/rU3 [10]. Праймери синтезовані фірмою НПФ «Литех», Росія. Реакційна суміш (40 мкл) складалась із 4 мкл буфера 10x для ПЛР; 1,2 мкл 1,6 мМ MgCl₂; 5 мкл 2,5 мМ dNTPs; 2 мкл 5 μМ праймеру fU5; 2 мкл 5 μМ праймеру rU3; 0,4 мкл 5U/μl Таq ДНК-полімерази (реактиви фірми «Амплисенс»); 22,8 мкл деіонізованої води і 2 мкл нерозведеної виділеної ДНК фітоплазми.

Для збільшення виходу продукту ПЛР проводили дві ампліфікації, оскільки після першої візуально продукт ПЛР не спостерігався.

Ампліфікація з цими праймерами складалась із 35 циклів: 95 °С 3 хв. - денатурації, 55 °С 1 хв. - відпалу і 72 °С 6 хв.30 сек. - елонгації в програмуваному термостаті “Терцик” фірми “ДНК – Технологія” (Росія). Для контролю чистоти реакції використовували деіонізовану воду. Продукти ПЛР (5 мкл) піддавали електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі в трис-борат-ЕДТА-буфері (ТВЕ) (трис-борат 90 мМ, ЕДТА 1 мМ; рН 8,2), використовуючи етидій бромід (EtBr). Як маркер молекулярної маси використовували фрагменти ДНК фага λ 2100 – 150 пар нуклеотидів. Продукт ПЛР мав молекулярну масу 826 п.о. (рис. 2). Результат реєстрували з допомогою УФ-трансілюмінатора з довжиною хвилі 312 нм і фотографували з допомогою відеосистеми «Biosom».

Результати та їх обговорення. В ході дослідження був встановлений відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської області. На насадженнях сорту Каберне Совіньйон на виноградниках Одеської області в результаті проведених досліджень виявили декілька зразків, уражених вірусом скручування 1 серотипу, на насадженнях сорту Шардоне було ідентифіковано фітоплазмове захворювання – почорніння деревини. Усього було досліджено 63 зразка сорту Каберне Совіньйон і 85 зразків сорту Шардоне. На наявність вірусу

скручування 1 і 3 серотипів були досліджені 267 зразків винограду сортів: Каберне Совіньйон, Шардоне. У ході досліджень було виявлено, що з загальної кількості проб, інфікованим вірусом скручування 3 серотипу виявився 1 зразок. Проведено візуальний санітарний контроль та вибіркочу ідентифікацію хвороби за допомогою методу ЗТ-ПЛР на базових та сертифікованих маточниках загальною площею 50 га. Виявлено та видалено 7 рослин з візуальними симптомами ураження вірусом скручування листя винограду і 45 рослин з симптомами почорніння деревини.

За допомогою цього методу була проведена перевірка значної частини матеріалу перспективних клонів, які були рекомендовані для подальшого розмноження, на латентне ураження вірусом скручування листя винограду. Усі тестовані куці виявилися вільними від вірусу скручування листя винограду.

В результаті проведених досліджень методами ІФА і ПЛР встановлено, що латентно ураженим вірусами скручування листя і коротковузля є садивний матеріал виробництва Молдова і Словенія (табл.1, табл.2) і ідентифіковано почорніння деревини на сорти Шардоне, виробництва Франція, Німеччина і Італія (табл. 3).

Таблиця 1

Виявлення вірусу скручування листя винограду в саджанцях імпортного виробництва

Сорт	Країна-імпортер			
	Молдова	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	+	+	-	-
Шардоне	+	-	-	-

При тестуванні садивного матеріалу сорту Каберне Совіньйон, виявлено, що латентно інфікованими вірусом скручування листя були саджанці виробництва Молдова і Словенія. Ураженим цим вірусом виявився і сорт Шардоне, виробництва Молдова.

Таблиця 2

Виявлення вірусу коротковузля винограду в саджанцях імпортного виробництва

Сорт	Країна-імпортер			
	Молдова	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	+	-	+	-
Шардоне	+	-	-	-

Тестування саджанців сорту Каберне Совіньйон і Шардоне показало, що латентно ураженими вірусом коротковузля виявились саджанці виробництва Молдова і Німеччина.

Таблиця 3

Виявлення фітоплазмової хвороби - почорніння деревини винограду в саджанцях імпортного виробництва

Сорт	Країна-імпортер			
	Італія	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	-	-	-	-
Шардоне	+	-	+	+

Таким чином, використовуючи сучасні методи діагностики можна попередити завезення ураженого садивного матеріалу і його розповсюдження.

Висновки

1. Встановлено, що найбільш ураженими латентною формою вірусів скручування листя і коротковузля винограду є садивний матеріал виробництва Молдова.
2. Використання сучасних методів діагностики, а саме методу ІФА і ПЛР дозволяє в короткий строк виявити і ідентифікувати вірусні хвороби винограду і тим самим запобігти їх розповсюдження.
3. Дослідження виноградних рослин сорту Шардоне показало, що він уражений фітоплазмовою інфекцією, а саме почорнінням деревини винограду, виробництва Франції, Італії і Німеччини.

Література

1. Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. - Кишинёв: Штиинца, 1985. - С. 212 – 242.
2. Гнutowa P. B. Иммунологические исследования в фитовирусологии. - М.: Наука, 1985. - С. 137 – 147.
3. Жунько И. Д. Применение иммуноферментного анализа для выявления вирусов винограда // Виноградарство и виноделие: Сб. научн. тр. ИВиВ «Магарач» - Ялта: ИВиВ «Магарач», 2003. - С. 16 - 18.
4. Bertaccini A., Vibio M., Schaff D., Murari M., Danielli A. Geographical distribution of elm yellows-related phytoplasmas in grapevine Flavescence doree outbreaks in Veneto (Italy)//12th Meeting of ICVG, Lisbon, Portugal, Sept 28-Oct 2. – 1997. – P. 57-58.
5. Bertaccini A., Davis R.E., Lee I.-M., Conti M., Dally E.L., Douglas S. M. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by dot hybridization and Southern blot analysis//Plant Dis. – 1990. – Vol. 74. – P. 40-43.
6. Langer M., Darimont H., Maixner M. Characterization of isolates of Vergilbungskrankheit-phytoplasma by rflp-analysis and their association with grapevine, herbaceous host plants and vectors//14th Meeting of ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, September 12-17, 2003. – 2003. – P. 71.
7. Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bove J.M. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of apple proliferation MLO//Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – P. 2916-2923.
8. Милкус Б.Н., Конуп Л.А., Жунько И.Д., Лиманська Н.В. Фитоплазменное заболевание винограда на Украине//“Магарач” Виноградарство и виноделие. – 2004. - № 3. – С. 12-14.
9. Rowhani A., Chay C., Golino D. A., Falk B. W. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue // Phytopathology. - 1993. – V. 83, № 7. - P. 749 – 753.
10. MacKenzie D. J., McLean M. A., Mukerji S., Green M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription - polymerase chain reaction // Plant disease. - 1997. - V. 81, № 2. - P. 222 – 226.

В.Л. Чистякова, Л.О. Конуп, А.І. Конуп

Идентификация вирусных и фитоплазменных болезней винограда методами ПЦР и ИФА

Сорта винограда, произрастающие в Украине, изучали на зараженность вирусными и фитоплазменными инфекциями методом полимеразной цепной реакции и методом иммуноферментного анализа. Установлено, что инфицированными вирусными и фитоплазменными инфекциями являются не только рядовой посадочный материал, но и сертифицированные клоны винограда импортного происхождения.

Ключевые слова: вирус короткоузлия винограда, вирус скручивания листьев винограда, фитоплазменная инфекция, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, виноград.

V. Chistyakova, L. Konup, A. Konup

Identification of viruses and phytoplasmas diseases of grapes PCR and ELISA

Grape sorts grown in Ukraine, have been examined for the contamination with viral and phytoplasma infections with the help of the methods of polymerase chain reaction and of immunoenzymatics analysis. It has been found out that not only standard plantings but also certified clones of imported grapes were infected by viral phytoplasma infections.

Key words: grapevine fanleaf virus, grapevine leafroll virus, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, infection of phytoplasma, grape.