

Л. О. Конуп, канд. біол. наук,
В. Л. Чистякова, ст. наук. спів.,
А. І. Конуп, наук. спів.,
Н. І. Ніколаєва, мол. наук. спів.

Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства ім.В.Є. Таїрова»,
Україна

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ КОРОТКОВУЗЛЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ТА ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Для виявлення вірусу коротковузля винограду (GFLV) застосовували методи імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В ході дослідження оптимізовано методику ПЛР. Проведено дослідження 370 зразків винограду із насаджень півдня України, Республіки Молдова на наявність латентної вірусної інфекції.

Ключові слова: імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, вірус коротковузля винограду (GFLV).

Вірус коротковузля відноситься до родини *Comoviridae*, роду *Nepovirus* і є одним з найбільш шкідливих патогенів винограду. Ізометрична вірусна частинка досягає 30 нм у діаметрі, її капсид складається з одного білка вагою 56 кДа. Геном вірусу представлений двома одноланцюговими позитивними РНК (РНК1 та РНК2). Вірус широко розповсюджений у світі. Поширення вірусу здійснюється нематодами *Xiphinema index* та *Xiphinema italiae* [1-3]. Інфікована рослина при вегетативному розмноженні може слугувати джерелом поширення вірусу на значній території. GFLV веде до значних втрат врожаю, погіршення його якості. Даний вірус викликає зменшення змісту цукру в ягодах на 1-3%, а втрати врожаю при даному захворюванні складають від 12 до 23% [4].

Саме тому GFLV входить до переліку вірусних інфекцій, на які, згідно з програмою сертифікації Європейського Співтовариства, виноград обов'язково тестується при виробництві садівного матеріалу.

Контроль за розповсюдженням GFLV відбувається за допомогою різноманітних засобів профілактики, які базуються на своєчасній ідентифікації та знищенні інфекційного матеріалу, що дозволяє зменшити рівень захворюваності та звести до мінімуму економічні втрати. Внаслідок цього визначення інфікованих рослин має дуже важливе значення.

З розвитком молекулярно-генетичних методів дослідження стало можливим встановлення наявності вірусу в рослині. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – метод, що знайшов широке застосування в діагностиці завдяки високій специфічності [3, 5-7].

Крім ПЛР одним із найбільш чутливих методів діагностики є імуноферментний аналіз (ІФА) [8]. Незважаючи на швидкий розвиток молекулярно-генетичних методів, ІФА поряд із ПЛР залишається самим надійним методом детекції вірусів винограду [9-11].

Тестування рослин на присутність патогенів дозволяє не тільки виявити заражені і вільні від збудників виноградники, але й сприяє вивченню екології збудників, розробці профілактичних заходів, спрямованих на боротьбу з GFLV.

Метою даної роботи було виявлення GFLV на виноградниках України і Молдови за допомогою ІФА і ПЛР та оптимізація методики ПЛР.

Матеріали і методи досліджень

За період з 2010 по 2015 роки були проведені скринінгові дослідження 370 зразків клонового та рядового матеріалу винограду різних сортів на наявність вірусу коротковузля (GFLV). Зразки відбирали на виноградниках півдня України та Республіки Молдова.

Відбір зразків. Для тестування кущів клонів винограду в серпні - вересні відбирали верхнє листя рослин. З настанням холодів виділення вірусу проводили в здерев'янілих пагонах. Зразки транспортували в лабораторію і досліджували в той же день або зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом декількох місяців.

Полімеразна ланцюгова реакція

Приготування зразків. Зразок вагою 100 мг готували з верхніх листів або зі скрібків здерев'янілих пагонів, поміщали у стерильну ступку і заливали 2 мл екстракційного карбонатного (GGB) буфера. Стерильною маточкою ретельно гомогенізували рослинну тканину. До складу GGB буфера (pH 9,6) входили наступні компоненти: Na_2CO_3 – 1,59 г/л, NaHCO_3 – 2,93 г/л, 20 г/л PVP-40, 2 г/л BSA, 0,5 г/л Tween 20, 10 г/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

До 25 мкл екстракційного гліцинового (GES) буфера додавали 2 мкл утвореної суспензії і протягом 10 хвилин суміш прогрівали у термостаті при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після цього зразки витримували на льоду 3 години. Отриману суспензію використовували в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією для виявлення GFLV (N. Nabili, особисте повідомлення). До складу GES буфера (pH 9,0) входили наступні компоненти: 0,05 М NaCl , 0,1 М гліцин, 1 мМ EDTA, 0,5% Тритон X-100.

Проведення зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР).

Використовували oligoC1 та oligoV1 праймери, підібрані до ділянки геному, що знаходиться на 3'-кінці РНК2 та кодує капсидний протеїн. Праймер oligoC1 є комплементарним до послідовності нуклеотидів 1064 – 1083 (5'CCAAAGTTGGTTTCCCAAGA3'), а праймер oligoV1 відповідає послідовності 762 – 781 (5'ACCGGATTGACGTGGGTGAT3') [3, 12].

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила по 12,71 мкл дейонізованої води, 2,5 мкл 10X ПЛР буфера (500 мМ KCl , 100 мМ Трис- HCl , pH 9,0), 2,5 мкл сахарози (20 %) і крезолу, 2,5 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), попередньо змішаних з 1,25 мкл 0,1 М дитіотриетолу (ДТТ), 1,25 мкл кожного із праймерів (10 мМ), 0,25 мкл Таq-полімерази (5 Од/мкл, «Амплиценс», Росія), 0,04 мкл ревертази (200 Од/мкл, «Амплиценс», Росія). В ході досліджень застосовували різні концентрації Mg^{++} (1,3 мМ, 1,7 мМ та 2,0 мМ) з метою зменшення неспецифічних продуктів ампліфікації.

У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

Зворотну транскрипцію проводили у термостаті при $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин. Ампліфікація включала 35 циклів ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 30 сек, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 45 сек, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 60 сек), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хвилин (Rowhani A., особисте повідомлення). Температуру відпалу змінювали у процесі підбору найкращого режиму ампліфікації для даного вірусу. Для ампліфікації використовували програмувальний термоциклер «Терцик» фірми «ДНК-Технология» (Росія).

Аналіз ПЛР продуктів. Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 1,5% агарозному гелі. Трис-боратний буфер для електрофорезу містив бромід етидію («Амплиценс», Росія). За допомогою відеосистеми «Samsung» гель фотографували в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм).

Позитивними контролями у ПЛР слугували зразки, приготовлені з верхнього листя інфікованих GFLV рослин, негативними контролями – дейонізована вода. В якості маркерів молекулярної ваги застосовували маркери 200 – 800 пар основ («Амплиценс», Росія).

Імуноферментний аналіз

Для ІФА використовували діагностичні набори фірми «AgriTest» (Італія). ІФА проводили відповідно до рекомендацій цієї фірми. Для виявлення GFLV використовували «сендвіч»-метод ІФА.

Результати та їх обговорення

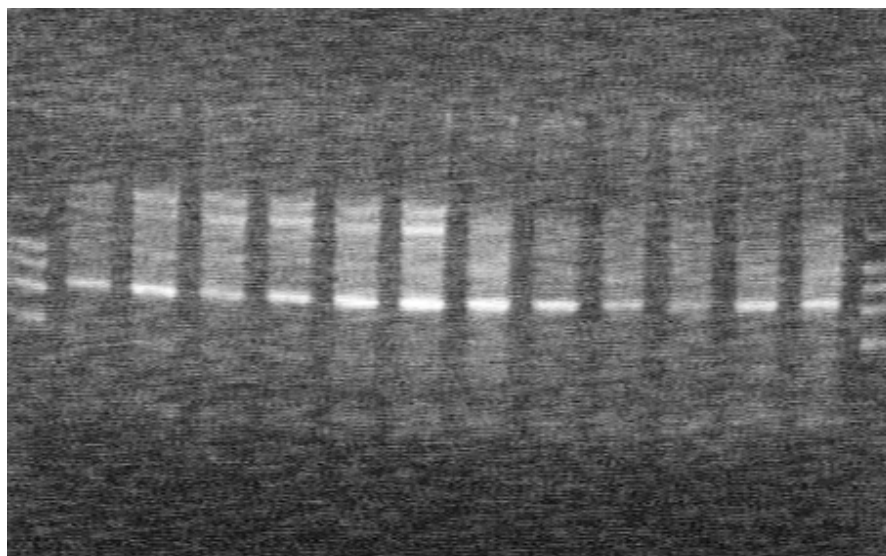
Звичайно ідентифікацію збудника здійснюють шляхом щеплення винограду досліджуваних сортів на сорти-індикатори. Однак цей метод потребує дослідження тривалістю від декількох місяців до одного року. В даній роботі тестування винограду на інфікованість GFLV проведено за допомогою ПЛР аналізу.

В процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з даною парою праймерів температура відпалу була змінена. Було застосовано декілька температур відпалу ($T_{\text{від}}$): 53 °C, 56 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C. Кращих результатів було досягнуто при температурах 53 °C і 61 °C. Синтезований при цих температурах фрагмент ДНК відповідав довжині амплікону для даної пари праймерів (321 п.о.) [8], крім того, спостерігалася менша кількість неспецифічних продуктів реакції, ніж при інших температурах.

З метою виключення неспецифічних продуктів реакції була встановлена оптимальна концентрація Mg^{++} у реакційній суміші для проведення ПЛР. За концентрації 1,3 мМ $MgSO_4$ і $T_{\text{від}} = 61$ °C не спостерігалася неспецифічних продуктів реакції, а кількість ампліфикованих фрагментів була достатньою для чіткої візуалізації в агарозному гелі. Збільшення концентрації магнію призводило до появи більш яскравих смуг ампліконів, тобто до збільшення ефективності ПЛР, але водночас спостерігалася поява смуг неспецифічної ампліфікації (рис. 1).

Застосування зазначених методів дослідження дозволило виявити інфікованість деяких прищепних сортів винограду вірусом коротковузля на насадженнях півдня України та Молдови.

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 М



п.о.

800

500

400

300

200

Рис.1. Електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі. 1, 2 – $T_{\text{від}} = 53$ °C, 1,3 мМ Mg^{++} ; 3, 4 – $T_{\text{від}} = 53$ °C, 1,7 мМ Mg^{++} ; 5, 6 – $T_{\text{від}} = 53$ °C, 2,0 мМ Mg^{++} ; 7, 8 – $T_{\text{від}} = 61$ °C, 1,3 мМ Mg^{++} ; 9, 10 – $T_{\text{від}} = 61$ °C, 1,7 мМ Mg^{++} ; 11, 12 – $T_{\text{від}} = 61$ °C, 2,0 мМ Mg^{++} ; М – маркери молекулярної ваги.

З 288 зразків винограду, відібраних на виноградниках Одеської та Херсонської областей, інфікованим вірусом GFLV виявився лише 1 зразок.

Два зразки, що надійшли з Республіки Молдова, виявилися ураженими GFLV, при цьому загальна кількість досліджених зразків складала 33.

Таким чином, для встановлення наявності вірусу коротковузля винограду поряд з імуноферментним аналізом можна успішно застосовувати полімеразну ланцюгову реакцію.

Висновки

1. Оптимізовано методику ПЛР для виявлення вірусу коротковузля винограду, а саме:
 - встановлена оптимальна температура відпалу для праймерів, що застосовувалися у ПЛР;

- з'ясована оптимальна концентрація магнію у реакційній суміші для усунення неспецифічних продуктів ПЛР.
2. Зразки матеріалу винограду різних сортів, відібрані на виноградниках півдня України, АР Крим та Республіки Молдова, містили збудника вірусу коротковузля винограду.

Використані джерела

1. Вердеревская Т. Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т. Д. Вердеревская, В. Г. Маринеску. – Кишинёв: Штиинца, 1985. – С. 212-222.
2. Esmenjaud D. Detection of a region of the coat protein gene of grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode *Xiphinema index* / D. Esmenjaud, P. Abad // Plant disease. – 1994. – V. 78. – № 11. – P. 1087-1090.
3. B. W. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue / A. Rowhani, C. Chay, D. Golino, A. Falk // Phytopathology. – 1993. – V. 83. – № 7. – P. 749-753.
4. Martelli G. P. Nature and physiological effects of grape vine diseases / G. P. Martelli, A. Graniti, G. L. Ercolani // Experientia. – 1986. – № 42. – P. 933-942.
5. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription - polymerase chain reaction / D. J. MacKenzie, M. A. McLean, S. Mukerji, M. Green // Plant disease. – 1997. – V. 81. – № 2. – P. 222 -226.
6. Improved PCR procedures for multiple identification of some artichoke and grapevine / A. Minafra, F. Grieco, D. Gallitelli, G. P. Martelli // Bulletin OEPP/EPPO. – 1995. – № 25. – P. 283-287.
7. Мулюкіна Н. А. Молекулярна гібридизація та полімеразна ланцюгова реакція у детекції вірусних хвороб винограду / Н. А. Мулюкіна // Вісник ОНУ. – 2003. – Т. 8. – № 1. – С. 68-74.
8. Жунько И. Д. Применение ИФА для выявления вирусов винограда / И. Д. Жунько // Виноградарство и виноделие: сб. науч. тр. ИВиВ «Магарач». – Ялта: ИВиВ «Магарач», 2003. – С. 16-18.
9. Гнутова Р. В. Иммунологические исследования в фитовирусологии / Р. В. Гнутова. – М.: Наука, 1985. – С. 137-147.
10. Clark M. F. Enzyme immunosorbent assay in plant virology / M. F. Clark, M. Bar-Joseph // Methods in virology. – 1984. – № 7. – P. 51-85.
11. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / A. Voller, A. Bartlett, D. E. Bidwel, M. F. Clark, A.W. Adams // Journal of General Virology. – 1976. – № 33. – P. 165-167.
12. Development of detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions / A. Rowhani, M. A. Mamingas, L. S. Lile, S. D. Daubert, D. A. Golino // Phytopathology. – 1995. – V. 85, № 3. – P. 347-352.

Конуп Л. А., Чистякова В. Л., Конуп А. И., Николаева Н. И.

Выявление вируса короткоузлия винограда при помощи иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции

Для выявления вируса короткоузлия винограда (GFLV) применяли методы иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции. В ходе исследования оптимизирована методика ПЦР. Проведено тестирование 440 образцов винограда на наличие латентной вирусной инфекции в насаждениях юга Украины и Республики Молдова.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, вирус короткоузлия винограда.

L. Konup, V. Chistyakova, A. Konup, N. Nikolaeva

Detection of grapevine fanleaf virus by immunoenzyme assay and polymerase chain reaction

The enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction have been used for detection of grapevine fanleaf virus (GFLV). The protocol of polymerase chain reaction was optimized during the investigation. 440 grapevine samples from vineyards of the Ukraine and Republic of Moldova were tested for the presence of latent viral infection.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction, grapevine fanleaf virus.