

## ДІАГНОСТИКА ВІРУСУ МАРМУРОВОСТІ ВІНОГРАДУ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Проведено дослідження клонового та рядового матеріалу винограду різних сортів на наявність вірусу мармуровості за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). У ході досліджень застосовано різні концентрації  $Mg^{++}$  (1,3, 1,7 та 2,0 ммоль/л) з метою зменшення неспецифічних продуктів ампліфікації. Температуру відгалу (T<sub>од</sub>) змінювано у процесі підбору найкращого режиму ампліфікації, °C: 52, 58, 60, 62. У ході дослідження встановлено оптимальну T<sub>од</sub> (62°C) та з'ясовано оптимальну концентрацію  $Mg^{++}$  у реакційній суміші (1,3 ммоль/л).

*The clonal and regular grapevine material of different cultivars has been tested for the presence of GFkV by polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR). Different concentrations of  $Mg^{++}$  (1,3 mM, 1,7 mM та 2,0 mM) were applied for decreasing of unspecific amplification products. Annealing temperature (T<sub>од</sub>) was changed to improve amplification results, °C: 52, 58, 60, 62. The optimal T<sub>од</sub> was established (62°C). Optimal  $Mg^{++}$  concentration in reaction mix (1,3 mM) was found out.*

**Вступ.** Вірус мармуровості винограду (GFkV) широко розповсюджений у всіх виноградарських районах світу. Це латентний ізометричний флоемолімітований вірус, який не передається механічним шляхом, розміром 28–30 нм, с одноланцюговою позитивно зарядженою молекулою олРНК довжиною 7564 пар основ. Філогенетичний аналіз вірусної реплікази та покривного білка показав, що GFkV, можливо, належать до родів *Tymovirus* та *Marafivirus*. Однак геномна організація вірусу, його

біологія, епідеміологія, цитопатологія та молекулярні властивості відрізняються від вказаних властивостей представників цих родів [1–7].

GFkV входить до переліку вірусних інфекцій, на які, згідно з програмою сертифікації ЄС, виноград обов'язково тестується при виробництві садівного матеріалу [8].

Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє розпізнати кущі з латентною інфекцією, і з них заготовлюється лоза для вегетативного розмноження рослин.

Багато років діагностика вірусу мармуровості базувалася на щепленні на сорт-індикатор Рупестрис дю Ло. Основна ознака захворювання – посвітління жилок третього порядку та тканин, які до них прилягають. Ріст індикатора пригнічується, листя стає більш хлоротичним, хвилястим [4, 9]. Проте цей метод потребує кількох років дослідження. Необхідною постає діагностика за допомогою сучасних швидких серологічних та молекулярно-генетичних методів аналізу. Метод полімеразної ланцюгової реакції дозволяє в стислі терміни визначити інфікованість кущів винограду вірусом [1, 6, 10, 11].

Метою даної роботи була оптимізація методики проведення ЗТ-ПЛР для діагностики вірусу мармуровості та дослідження деяких сортів винограду на наявність даного фітопатогену.

**Матеріали і методи.** Досліджували клоновий і рядовий матеріал прищепних сортів винограду господарств півдня України та Республіки Молдова.

Для тестування кущів клонів винограду на наявність GFKv у серпні–вересні відбирали верхівки молодих пагонів з верхнім листям. З настанням холодів виділення вірусу проводили у здерев'янілих пагонах. Зразки транспортували в лабораторію і досліджували в той самий день або зберігали за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  впродовж кількох місяців. Зразки для проведення ПЛР готували згідно з [12].

Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції й полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила деіонізовану воду, 2,5 мкл 10-кратного ПЛР буфера (500 ммоль/л KCl, 100 ммоль/л Tris-HCl, pH 9,0), 2,5 мкл сахарози (20 %) і крезолу, 2,5 мкл дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP) (2 ммоль/л), попередньо змішаних з 1,25 мкл дитіотриетолу (ДТТ) (0,1 моль/л), 1,25 мкл кожного з праймерів (10 ммоль/л), 1,25 од. Таq-полімерази (5 од./мкл, "АмпліСенс", Росія), 8 од. ревертази (200 од./мкл, "АмпліСенс", Росія). Було випробовано концентрації  $\text{Mg}^{++}$  1,3, 1,5 і 2 ммоль/л. Використовували RD1 (5' C(CT)CA(AG)CA(CT)AA(AG)GT(ACG)AACGA 3') та RD2 (5' GCGCATGCA(CGT)GT(CG)AG(AG)GGG 3') GFKv праймери [2].

У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

Як позитивний контроль використовували інфікований вірусом мармуровості матеріал винограду, люб'язно наданий доктором Д. Босція (Університет Барі, Італія). Як негативні контролю використовували деіонізовану воду (для перевірки якості реактивів) та вільний від вірусу рослинний матеріал.

Зворотну транскрипцію проводили в термостаті за  $52^{\circ}\text{C}$  впродовж 30 хв. Ампліфікація включала 35 циклів ( $94^{\circ}\text{C}$  – 30 с,  $56^{\circ}\text{C}$  – 45 с,  $72^{\circ}\text{C}$  – 60 с), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хв (А. Ровгані, особисте повідомлення). Температуру відпалу ( $T_{\text{від}}$ ) змінювали у процесі підбору найкращого режиму ампліфікації,  $^{\circ}\text{C}$ : 52, 58, 60, 62.

Реакція проходила у програмувальному термостаті "Терцик" фірми "ДНК-Технологія" (Росія). Електрофорез проводили в 1,5%-ному агарозному гелі. Бромистий етидид для візуалізації продуктів ПЛР входить до складу трис-боратного буфера для електрофорезу ("АмпліСенс", Росія). Гель фототрафували за допомогою відеосистеми "Samsung" в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної маси ампліфікованих фрагментів використовували маркери 800–200 пар основ ("АмпліСенс", Росія) та маркери фрагменти ДНК фага  $\lambda$  2100–150.

**Результати та їх обговорення.** У ході дослідження методики проведення ПЛР для виявлення вірусу мармуровості винограду було оптимізовано.

У процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з даною парою праймерів температуру відпалу змінювали. Було застосовано кілька  $T_{\text{від}}$ ,  $^{\circ}\text{C}$ : 52, 58, 60, 62.

Кращий результат було досягнуто за температури  $62^{\circ}\text{C}$ . Синтезований за цієї температури фрагмент ДНК відпавдав довжині амплікону для даної пари праймерів (386 п.о.), крім того, меншою була кількість неспецифічних продуктів реакції, ніж за інших температур відпалу.

З метою виключення неспецифічних продуктів реакції було встановлено оптимальну концентрацію  $\text{Mg}^{++}$  у реакційній суміші для проведення ПЛР. За концентрації 1,3 ммоль/л  $\text{MgSO}_4$  і  $T_{\text{від}} = 62^{\circ}\text{C}$  неспецифічні продукти реакції були відсутніми, а кількість ампліфікованих фрагментів достатньою для чіткої візуалізації в агарозному гелі.

За допомогою оптимізованої методики ПЛР проведено тестування зразків рослинного матеріалу. Виявлено, що вірус мармуровості поширений на різних прищепних сортах винограду.

Дослідження матеріалу винограду показало, що вірус мармуровості виявлявся в насадженнях на території України рідше, ніж на території Молдови, де в деяких випадках визначалася стовідсоткова інфікованість рослин певного клону (див. рис.).



Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР в агарозному гелі:

1 – негативний контроль; 2–6, 8–12 – позитивні зразки матеріалу винограду, ураженого вірусом мармуровості; 7 – позитивний контроль; М – маркери молекулярної маси (2100, 1400, 1000, 600, 470, 280, 150)

Подальше вивчення поширення вірусу мармуровості дозволить отримати дані щодо епідеміології збудника на виноградниках півдня України та Молдови, а також дані щодо якості садівного матеріалу, який інтродукується з-за кордону.

#### Висновки:

- Оптимізовано методику ЗТ-ПЛР для виявлення вірусу мармуровості винограду, а саме:
  - встановлено оптимальну температуру відпалу для праймерів, що застосовувалися у ЗТ-ПЛР;
  - з'ясовано оптимальну концентрацію магнію в реакційній суміші для усунення неспецифічних продуктів ПЛР.
- Зразки матеріалу винограду різних сортів, відібрані на виноградниках півдня України та Молдови, містили збудника вірусу мармуровості винограду.

- Beaino T. E., Sabanadzovic S., Digiaro M. et al // *Vitis*. – 2001. – Vol. 40, № 2. – P. 65–68.
- Boscia D., Martelli G. P., Savino V., Castellano M. A. // *Vitis*. – 1991. – Vol. 30. – P. 97–105.
- Bouliia M., Boscia D., Tertizzi B. et al. // *J. Phytopathol.* – 1990. – Vol. 129. – P. 151–158.
- Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis / Ed. by G.P. Martelli – Rome, 1993.
- Sabanadzovic N., Saldarelli P., Martelli G. P. // *J. Gen. Vir.* – 2001. – Vol. 82. – P. 2009–2015.
- Sabanadzovic S., Abou Ghanem N., Castellano M. A. et al. // *Arch. Virol.* – 2000. – Vol. 145. – P. 553–5657.
- Walter B., Martelli G. P. Clonal and sanitary selection of the grapevine // *Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases* – Pans, 1997. – P. 43–95.
- Walter B., Martelli G. P. // *Vitis*. – 1998. – Vol. 37, № 2. – P. 87–90.
- Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда – Кишинев, 1985.
- Sabanadzovic S., Saldarelli P., Savino V. // *Vitis*. – 1996. – Vol. 35. – P. 137–140.
- Schieber O., Seddas A., Belin C., Walter B. // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1997. – Vol. 103. – P. 767–774.
- Rowhani A., Biardi L., Johnson R. et al. // XIII<sup>th</sup> ICVG Meeting: Abstracts (Adelaide, Australia, 12–17 March 2000). – Adelaide, 2000. – P. 148.