

УДК 578.5:632.38:634.8.03/.05

І. Д. Жунько, асп., **Н. В. Ліманська**, асп., **Б. Н. Мілкус**, д-р біол. наук, проф., **Л. О. Конуп**, наук. співроб.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології та вірусології,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65026, Україна,
Тел.: (048)7487131, e-mail: zhunkin@mail.ru.

ЗТ-ПАР ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДІВ *VITIVIRUS* ТА *FOVEAVIRUS*, ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ ВИНОГРАДУ

Для ідентифікації вірусів А, В винограду, борознистості деревини Рупестріс застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією. В ході дослідження оптимізовані параметри реакції — температура відпалу та концентрація магнію.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, зворотна транскрипція, вірус А винограду (GVA), вірус В винограду (GVB), борознистість деревини Рупестріс (RSPaV).

Комплекс борознистості деревини (англ. — "Rugose wood complex" — RWC) складається з чотирьох окремих захворювань, які широко розповсюджені у всьому світі та характеризуються утворенням ямок і борознин на здерев'янілому циліндрі [1, 2].

До складу RWC входять представники двох самостійних родів *Foveavirus* та *Vitivirus* [1, 2, 3, 4, 5, 6]:

- Борознистість деревини Рупестріс — англ. — "Rupestris stem pitting" — RSPaV;
- Вірус В винограду (опробковіння кори) — англ. — "Grapevine virus B" — GVB;
- Вірус А винограду (ямчатість деревини Кобера) — англ. — "Grapevine virus A" — GVA;
- Ямчатість деревини ЛН 33 — англ. — "LN 33 stem grooving".

Гнучкі вірусні ниткоподібні частинки сягають у розмірі 800 x 12 нм, капсид складається з одного білка вагою 22–26 кДа у вітівірусів — GVA, GVB та 28 кДа — у RSPaV [1, 3, 7]. Геном вірусів представлений однією одноланцюговою позитивною молекулою РНК [2, 3].

Поширення вірусів здійснюється за щеплення рослин, недоброякісним садівним матеріалом, борошністими червцями (*GVA*, *GVB*) (*Pseudococcus affinis*, *Ps. longispinus*, *Planococcus citri*, *Pl. ficus*) та механічним шляхом [6, 8, 9].

Дані віруси можуть викликати затримку росту кущів та слабкий хлороз листя. Специфічними симптомами для цієї групи захворювань

є утворення на штабмі, іноді на рукавах та корінні ямок, видовжених борознинок довжиною 50 мм, що сприяє розтріскуванню штамба і рукавів [10, 11].

Серед захворювань RWC борознистість деревини Рупестріс найбільш розповсюджена у світі, мабуть завдяки тому, що найчастіше вона протікає у латентній формі, не викликаючи характерних симптомів та не впливаючи на ріст і врожайність кущів [2].

Усі вищезазначені віруси входять до системи сертифікації Європейського Співтовариства, згідно з якою виноград обов'язково тестується при виробництві садівного матеріалу [12].

Існує декілька методів тестування винограду на наявність вірусів даної групи:

1. Візуальний (фітосанітарний) контроль — ускладнюється латентною інфекцією;
2. Індикація щепленням на індикаторні сорти Рупестріс дю Ло, Кобера 5 ББ, ЛН 33 та інші. Характерні симптоми проявляються на другий — третій рік після зараження;
3. Серологічний метод — імуноферментний аналіз (для GVA, GVB) [13, 14];
4. Молекулярно-біологічний метод — полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) [1, 11].

Останні два методи є найбільш надійними для діагностики вірусних захворювань винограду.

Метою даної роботи було налагодження методики та оптимізація параметрів реакції ЗТ-ПЛР для виявлення GVA, GVB, RSPaV.

Матеріал і методи досліджень

Для налагодження методики використовували зразки, приготовлені з верхнього листа інфікованих кущів винограду, люб'язно наданих доктором D. Boscia (університет Барі, Італія).

Зразок вагою 100 мг поміщали у стерильну ступку, заливали 2 мл екстракційного карбонатного (GGB) буфера та ретельно гомогенізували. До складу GGB буфера (pH 9,6) входили наступні компоненти (г/л): Na_2CO_3 — 1,59, NaHCO_3 — 2,93, PVP-40 — 20, BSA — 2, Tween 20 — 0,5, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ — 10.

Утворену суспензію в об'ємі 2 мкл додавали до 25 мкл екстракційного гліцинового (GES) буфера (0,05 М NaCl, 0,1 М гліцин, 1 мМ ЕДТА, 0,5 % Тритон X-100, pH 9,0) і протягом 10 хвилин суміш прогрівали у термостаті при 95 °С. Потім зразки витримували 3 години на льоду [15]. Отриману суспензію використовували в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією для виявлення GVA, GVB, RSPaV, параметри якої люб'язно повідомив доктор N. Nabili (Австралія).

Для проведення ЗТ-ПЛР використовували наступні пари праймерів:

1. для детекції GVA — С 995 (5' — AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG — 3') та Н 587 (5' — GACAAATGGCACACTACG — 3') [16];

2. для детекції GVB — С 410 (5' — ATCAGCAAACACGCTTGAACCG — 3') та Н 28 (5' — GTCCTAAGAACGTCTTCACAGC — 3') [17];
3. для детекції RSPaV — 13 (5' — GATGAGGTCCAGTTGTTTCC — 3') та 14 (5' — ATCCAAAGGACCTTTTGACC — 3') [2].

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила по 12,71 мкл дейонізованої води, 2,5 мкл 10X ПЛР буфера (500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl, рН 9,0), 2,5 мкл сахарози 20 % і крезолу, 2,5 мкл 2 мМ дезокси-нуклеозидтрифосфатів (dNTP), попередньо змішаних з 1,25 мкл 0,1 М дитіотриетолу (ДТТ), 1,25 мкл кожного із праймерів (10 мМ), 0,25 мкл Taq-полімерази (5 Од/мкл, "Ампли-Сенс", Росія), 0,04 мкл ревертази (200 Од/мкл, "АмплиСенс", Росія). В ході досліджень застосовували різні концентрації Mg^{++} . У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

Зворотну транскрипцію провадили 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 (Rowhani A., особисте повідомлення). Температуру відпалу ($T_{від}$) змінювали у процесі підбору найкращого режиму ампліфікації для даного вірусу. Для ампліфікації використовували програмувальний термоциклер "Терцик" фірми "ДНК-Технология" (Росія).

Електрофорез продуктів ПЛР провадили у 1,5 % агарозному гелі. Tris-боратний буфер для електрофорезу містив бромід етидію ("АмплиСенс", Росія). За допомогою відеосистеми "Samsung" гель фотографували в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм).

В якості маркерів молекулярної ваги застосовували маркери 200–800 пар основ ("АмплиСенс", Росія) та маркери — фрагменти ДНК фага λ розміром 150–2100 пар основ. Негативними контролюми слугувала дейонізована вода та екстракти здорових рослин.

Результати та їх обговорення

Ампліфікація з парами праймерів С 995 та Н 587, С 410 та Н 28 послідовностей геному вірусів GVA і GVB призвела до появи чітких смуг ампліконів заданої довжини (430 п. о. та 450 п. о. відповідно) за умовами ЗТ-ПЛР, описаними А. Rowhani, а саме при температурі відпалу ($T_{від}$) 56 °С та концентрації Mg^{++} 1,5 мМ (рис. 1).

У випадку тестування рослин на присутність вірусу RSPaV реакція потребувала подальшої оптимізації, оскільки вказані параметри не дозволяли отримати достатню кількість одиничного продукту ЗТ-ПЛР.

В процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з парою праймерів 13 та 14 до послідовності геному RSPaV температура відпалу була змінена. Було застосовано декілька температур відпалу ($T_{від}$): 52 °С, 56 °С, 58 °С, 60 °С. Кращих результатів було досягнуто при температурі 60 °С. За таких умов синтезувався фрагмент ДНК (рис. 2), який відповідав довжині амплікону для даної пари праймерів 339 п. о. [2].

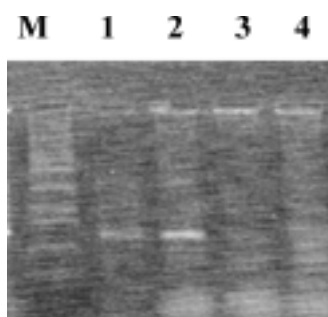


Рис. 1. Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР в агарозному гелі: 1, 2 — позитивні контролі GVA; 3, 4 — негативні контролі; М — маркери молекулярної ваги (2100, 1400, 1000, 600, 470, 280, 150).

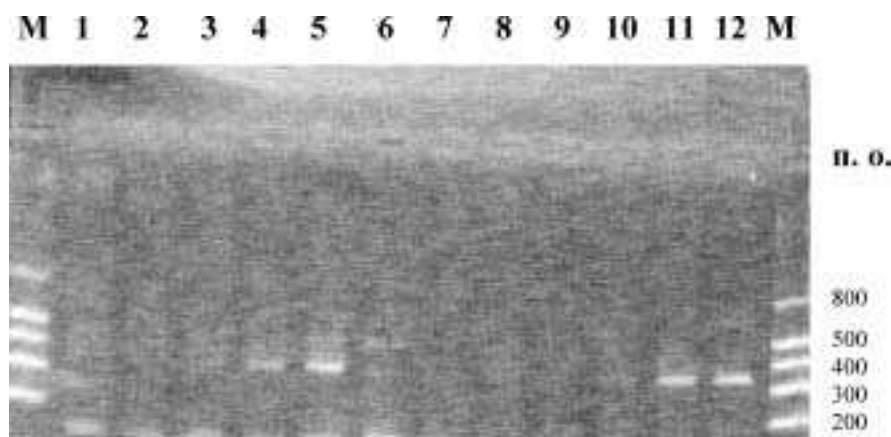


Рис. 2. Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР в агарозному гелі: 1–3 — $T_{\text{від}} = 52^\circ\text{C}$; 4–6 $T_{\text{від}} = 56^\circ\text{C}$; 7–9 — $T_{\text{від}} = 58^\circ\text{C}$; 10–12 — $T_{\text{від}} = 60^\circ\text{C}$; М — маркери молекулярної ваги

Крім того, встановлювали оптимальну концентрацію Mg^{++} у реакційній суміші. З метою отримання великої кількості ампліконів та уникнення неспецифічних продуктів ампліфікації випробовували наступні концентрації: 1,0 мМ, 1,2 мМ та 1,5 мМ (рис. 3).

За результатами цих дослідів оптимальні параметри ЗТ-ПЛР для виявлення вірусу RSPaV були наступними: концентрація MgSO_4 — 1,5 мМ та $T_{\text{від}} = 60^\circ\text{C}$.

Вищезгадані налагоджені та оптимізовані методики ЗТ-ПЛР для ідентифікації представників родів *Vitivirus* та *Foveavirus*, що паразитують на винограді, можуть успішно застосовуватися для скринінга великої кількості рослин. Подальші дослідження дозволять вивчити епідеміологію та розповсюдження збудників цих захворювань в Україні.

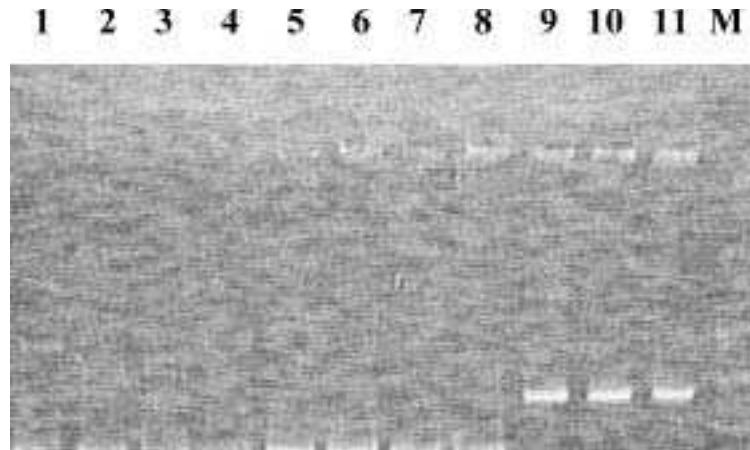


Рис. 3. Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР в агарозному гелі: 1–3 — 1,0 мМ Mg^{++} ; 4–6 — 1,2 мМ Mg^{++} ; 7, 8 — негативні контролю; 9–11 — 1,5 мМ Mg^{++} ; М — маркери молекулярної ваги (2100, 1400, 1000, 600, 470, 280, 150 п. о.).

Висновки

1. Вперше в Україні налагоджена методика ЗТ-ПЛР для виявлення вірусів комплексу борознистості деревини (GVA, GVB, RSPaV);
2. Встановлена оптимальна температура відпалу для праймерів 13 і 14 та з'ясована оптимальна концентрація магнію у реакційній суміші для детекції RSPaV.

Висловлюємо щирі подяки доктору А. Rowhani (США), доктору D. Boscia (Італія) та доктору N. Nabili (Австралія) за надану допомогу та консультації в процесі роботи по ЗТ-ПЛР-діагностиці.

Література

1. *Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis* / Ed. G. P. Martelli. — Rome: FAO, 1993. — 263 p.
2. Meng B. Z., Johnson R., Peressini S., Forsline P. L., Gonsalves D. Rupestris stem pitting-associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting // *Eur. J. Plant Pathol.* — 1999. — V. 105. — P. 191–199.
3. Краев В. Г. Современная классификация и номенклатура вирусов растений // *Микробиол. журн.* — 2001. — Т. 63, № 2. — С. 20–66.
4. Dovas C. I., Katis N. I. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Vitivirus and Foveavirus genera in grapevine // *J. Virol. Meth.* — 2003. — V. 170. — P. 99–106.
5. Martelli G. P., Minafra A., Saldarelli P. Vitivirus, a new genus of plant viruses // *Arch. Virol.* — 1997. — V. 142. — P. 1929–1932.
6. Minafra A. Rugose wood of grapevines // XIIIth ICVG meeting: Abstracts (Adelaide, Australia, 12–17 march 2000). — Adelaide, 2000. — P. 30–34.
7. Zhang Y., Uyemoto J. K., Golino D. A., Rowhani A. Nucleotide sequences and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease // *Phytopathology.* — 1998. — V. 88. — P. 1231–1237.

8. *La notte F., Buzkan N., Choueiri F.* et al. Acquisition and transmission of grapevine virus A by the mealybug *Pseudococcus longispinus* // *J. Plant pathol.* — 1997. — V. 78. — P. 79–85.
9. *Tanne E., Ben-Dov Y., Rassah B.* Mealybug transmission of corky bark disease and an associated virus to healthy grapevine // XIth ICVG meeting: Abstracts (Montreux, Switzerland, 6–9 September 1993). — Montreux, 1993. — P. 59–60.
10. *Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г.* Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинёв: Штиинца, 1985. — С. 238–242.
11. *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.* — Paris: INRA, 1997. — P. 43–95.
12. *Walter B., Martelli G. P.* Considerations on grapevine selection and certification // *Vitis.* — 1998. — V. 37, № 2. — P. 87–90.
13. *Гнутова Р. В.* Иммунологические исследования в фитовирусологии. М.: Наука, 1985. — С. 137–147.
14. *Жулько И. Д.* Применение ИФА для выявления вирусов винограда // *Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ "Магарац"* — Ялта: ИВиВ "Магарац", 2003. — С. 16–18.
15. *Rowhani A., Biardi L., Johnson R.* et al. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses // XIIIth ICVG meeting: Abstracts (Adelaide, Australia, 12–17 March 2000). — Adelaide, 2000. — P. 148.
16. *Minafra A., Hadidi A., Martelli G. P.* Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction // *Vitis.* — 1992. — V. 31. — P. 221–227.
17. *Minafra A., Hadidi A.* Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification // *J. Vir. Methods.* — 1994. — № 47. — P. 175–188.

И. Д. Жулько, Н. В. Лиманская, Б. Н. Милкус, Л. А. Конуп

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
Дворянская, 2, г. Одесса, 65026, Украина,
Тел.: (048)7487131, e-mail: zhunkin@mail.ru.

ОТ-ПЦР ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ VITIVIRUS И FOVEAVIRUS, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ВИНОГРАДА

Резюме

Для идентификации вирусов А, В винограда, бороздчатости древесины Рупестрис применяли метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. В ходе исследования оптимизированы параметры реакции — температура отжига и концентрация магния.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, обратная транскрипция, вирус А винограда (GVA), вирус В винограда (GVB), бороздчатость древесины Рупестрис (RSPaV).

I. D. Zhunko, N. V. Limanska, B. N. Milkus, L. O. Konup

Odessa National University, Department of microbiology and virology
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**RT-PCR IDENTIFICATION OF GRAPEVINE DISEASE AGENTS –
THE MEMBERS OF THE *VITIVIRUS* AND *FOVEAVIRUS* GENERA**

Summary

The polymerase chain reaction with reverse transcription has been used for identification of the grapevine virus A, the grapevine virus B, Rupestris stem pitting associated virus. The parameters of the reaction — annealing temperature and magnesium concentration were optimized during the investigation.

Keywords: polymerase chain reaction, reverse transcription, the grapevine virus A (GVA), the grapevine virus B (GVB), Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV).