

УДК: 578.5:632.38:634.8.03/.05

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ КОРОТКОВУЗЛЯ ВИНОГРАДУ В ПРОЦЕСІ ВИРОБНИЦТВА СЕРТИФІКОВАНОГО САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ

А.І. Конуп, аспірантка*

Обстежено базові і сертифіковані маточні насадження винограду у господарствах Одеської області. Використано методуку ідентифікації вірусної хвороби – коротковузля винограду (GFLV) Рання діагностика коротковузля винограду методом полімеразної ланцюгової реакції дозволяє швидко визначити якість садивного матеріалу винограду. Виявлено виноградні рослини з симптомами та в латентній формі вірусної хвороби винограду.

Ключові слова: виноград, віруси винограду, полімеразна ланцюгова реакція, ідентифікація.

Вірусні захворювання істотно знижують кількість і погіршують якість винограду, вихід першосортних саджанців у шкільці і довговічність виноградних кущів. Характерна особливість вірусних захворювань полягає у тому, що вони є системними і хронічними, тобто тканини, а часом і клітини заражених рослин залишаються хворими впродовж усього життя [1]. Тому вегетативне розмноження заражених кущів призводить до виробництва хворого садивного матеріалу, сприяючи тим самим, подальшому поширенню вірусів.

Єдиним ефективним способом боротьби з хворобами винограду вірусної етіології нині визнана система санітарної селекції, яка ґрунтується на отриманні безвірусного садивного матеріалу і закладки нових насаджень в умовах, що виключають вторинне зараження [7].

Найшкідливішим серед вивчених вірусів, є вірус коротковузля (GFLV), який належить до родини *Comoviridae*, роду *Nepovirus*. Поширення його здійснюється нематодами *Xiphinema index* та *Xiphinema italiae* [7]. Інфікована

*Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор Б.Н. Мілкус

рослина при вегетативному розмноженні може бути джерелом поширення вірусу на значній території і призвести до значних втрат врожаю та погіршення його якості. Цей вірус спричиняє зменшення змісту цукру в ягодах на 1 - 3 %, і втрати врожаю від 12 до 23 % [6].

Симптоми хвороби залежать від чутливості сорту та вірулентності патогена. Спочатку на листі з'являються світло-зелені плями, пізніше спостерігаються симптоми асиметрії та редукції листя, нетипове жилкування, на пагонах утворюються подвійні вузли та короткі міжвузля [6].

Часто вірусні хвороби винограду протікають у прихованій латентній формі, без наявних симптомів [6]. Нині сертифікація садивного матеріалу в Україні є актуальною, тому що діагностику вірусних хвороб у більшості господарств проводять за допомогою візуального фітосанітарного обстеження. Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє виявити кущі з латентною інфекцією і запобігти заготівлі з них лози для вегетативного розмноження рослин. Досі діагностика вірусу коротковузля базувалася на щепленні на сорти-індикатори. Однак цей метод потребує декількох років дослідження. Отже, необхідно застосовувати нові молекулярно-біологічні методи діагностики, підбирати умови їх проведення, розробити діагностичні тест-системи для проведення діагностики вірусних хвороб методом полімеразної ланцюгової реакції, який дозволяє швидко визначати інфікованість кущів винограду фітопатогенними вірусами [2].

Метою дослідження було впровадження у систему санітарної селекції методу ПЛР-діагностики вірусу коротковузля винограду.

Матеріали і методи досліджень. Для вивчення вірусу коротковузля винограду використовували зразки із специфічними симптомами захворювання і без них (рис.1).



Рис.1. Морфологічні зміни листків винограду, зараженого вірусом коротковузля (сорт Одеський сувенір)



Рис.2. Морфологічні зміни листкової пластинки і забарвленості листя винограду, зараженого вірусом коротковузля (сорт Одеський сувенір).

Виявлення кущів винограду з симптомами коротковузля в Одеській області.

Зона обстеження	Зовнішні симптоми ураження кущів винограду	Детекція GFLV методом ЗТ ПЛР	Ураження, % M± m
Одеська обл., Овідіопольський р-н Приватне підприємство	Немає	+	1,3±0,5
Одеська обл., Овідіопольський р-н ТОВ	Симптоми асиметрії та редукції листя, нетипове жилкування	+	0,7±0,3
Одеська обл., Овідіопольський р-н АСТ	Світло-зелені плями на листі	-	-
Одеська обл., Овідіопольський р-н ДГ	На пагонах подвійні вузли та короткі міжвузля	+	2,1±0,3

При обстеженні базових і сертифікованих маточних насаджень винограду в господарствах Одеської області в період з травня 2010 р. до червня 2012 р. було відібрано близько 350 зразків, на 17 з яких виявили симптоми, характерні для вірусу коротковузля (рис.1, 2).

Для тестування кущів клонів винограду на наявність GFLV в серпні - вересні відбирали верхні листки рослин. Виділення вірусу проводили у здерев'янілих пагонах [5]. Для діагностики та ідентифікації вірусу коротковузля застосовували метод ПЛР із зворотною транскрипцією. Зразки для проведення ПЛР готували згідно з [4]. Екстракцію ДНК із зразків винограду проводили за допомогою набору «ДНК-Сорб С» (виробництва ЦНП епідеміології РФ, м. Москва).

У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка. Як позитивний контроль використовували інфікований вірусами коротковузля матеріал винограду D. Voscia (Барійський університет, Італія), як негативний - деіонізовану воду.

Зворотну транскрипцію проводили у термостаті при температурі 52 °С протягом 30 хв. Ампліфікація складалася з 35 циклів (94 °С – 30 с, 56 °С – 45 с, 72 °С – 60 с), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хв [3, 8]. У ході дослідження температуру відпалу збільшили до 61 °С.

Реакцію здійснювали у програмувальному термостаті „Терцик” фірми „ДНК – Технологія” (Росія), електрофорез - в 1,5 % - вому агарозному гелі. Синтезований при цих температурах фрагмент ДНК відповідав довжині амплікону для кожної пари праймерів (321 п.о.), крім того, спостерігалася менша кількість неспецифічних продуктів реакції, ніж при інших температурах [5].

Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-боратного буфера для електрофорезу („Амплиценс”, Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми „Mintron” в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Молекулярну масу ампліфікованих фрагментів оцінювали за допомогою маркера 800 – 200 пар основ нуклеотидів

(„Амплиценс”, Росія). Вірус коротковузля винограду діагностували методом ЗТ-ПЛР-Rt у реальному часі. Використовували праймери oligoC1/oligoV1. На основі нуклеотидних послідовностей генів було підбрано праймери і зонди, мічені флуоресцентними мітками FAM, JOE, які дозволяють проводити детекцію флуоресценції у режимі реального часу. Ампліфікацію здійснювали згідно з рекомендаціями [9] у термоциклері Rotor Gene 6000 (Corbett, Австралія).

Результати дослідження. Під час електрофоретичного розділення ідентифіковано РНК-фрагмент розміром близько 320 пар нуклеотидних залишків (п.о.) (рис.3).

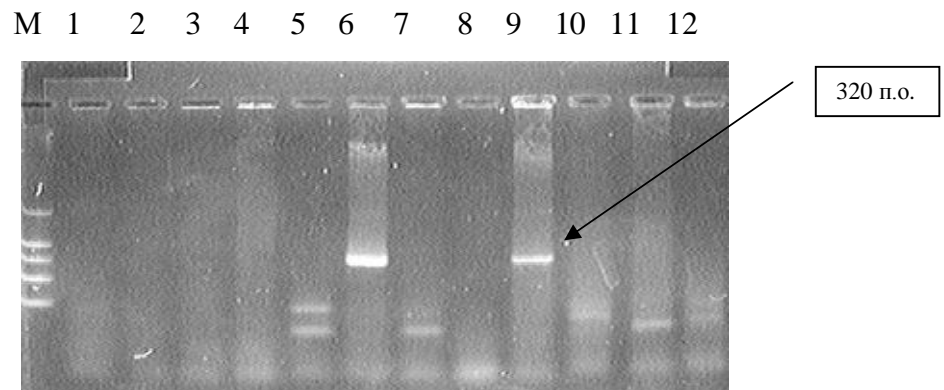


Рис.3. Електрофорез продуктів реакції в агарозному гелі. 6 – зразки, інфіковані вірусом коротковузля винограду, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 – зразки, що не містять вірусу коротковузля; 1 – негативний контрольний зразок; 9 – контрольний зразок - позитивний, уражений вірусом коротковузля; М – маркер молекулярної маси (200 – 800 пар основ, “Амплиценс”, Росія).

Діагностика вірусу коротковузля методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу забезпечує отримання найбільш якісних і точних результатів ПЛР-анализу, замінює детекцію продуктів ПЛР методом електрофорезу (рис.4). При цьому немає сенсу відкривати і доставати продукти ампліфікації, що зводить до мінімуму ризик контамінації лабораторії продуктами ПЛР. Автоматичний облік

результатів дозволяє виключити суб'єктивні помилки при інтерпретації отриманих даних.

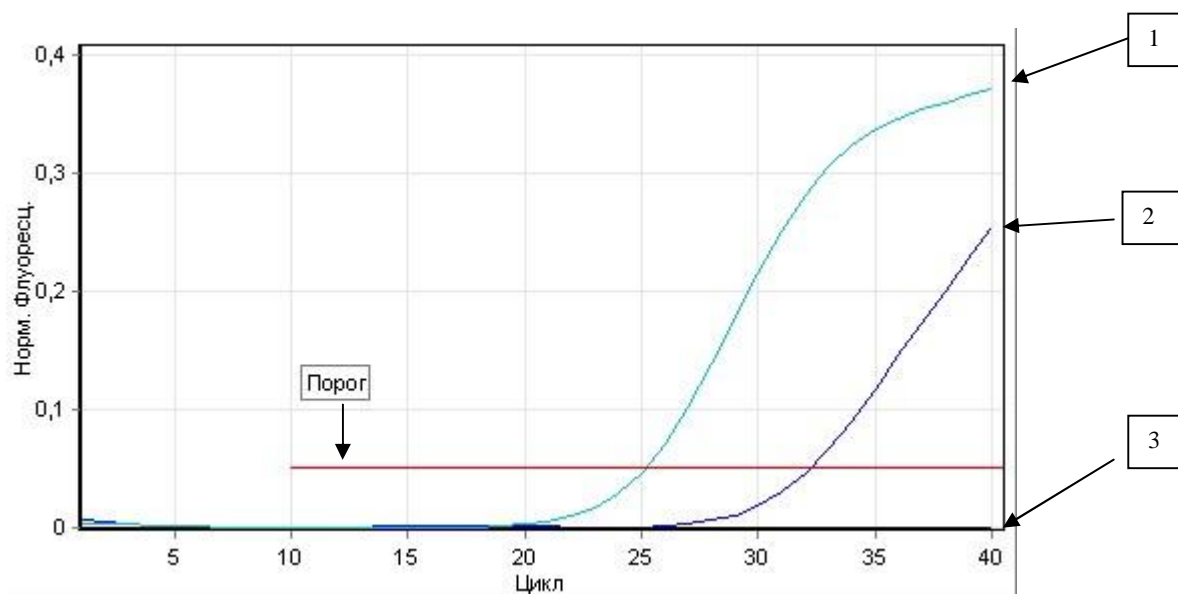


Рис. 4. Детекція вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу. 1- зразок, заражений вірусом коротковузля; 2 - позитивний контроль, 3 – негативний контроль.

Попередні результати апробації методики ЗТ-ПЛР-RT вірусу коротковузля свідчать про її високу аналітичну чутливість і специфічність.

У ході дослідження був встановлений відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської області.

Висновки

1. Розроблена методика виявлення вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР з детекцією флуоресценції в режимі реального часу.
2. Оптимізовано методику ЗТ-ПЛР з детекцією результатів після закінчення (за кінцевою точкою), яка використовується переважно для виявлення фітопатогенів.

Список літератури

1. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Вердеревская Т.Д. - Кишинев: Штинца, 1985. – 236 с.
2. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue / [Rowhani A., Chay C., Golino D. A., Falk B. W.] // *Phytopathology*. - 1993. – Vol. 83, № 7. - P. 749 – 753.
3. Development of detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions / [Rowhani A., Mamingas M. A., Lile L. S. et al.] // *Phytopathology*.- 1995. – Vol. 85, № 3. - P. 347 – 352.
4. Identification of the agent of grapevine fleck disease / [Boscia D., Martelli G. P., Savino V., Castellano M. A.] // *Vitis*. – 1991. – Vol. 30. – P. 97 – 105.
5. Improved PCR procedures for multiple identification of some artichoke and grapevine / [Minafra A., Grieco F., Gallitelli D., Martelli G. P.]// *Bulletin OEPP/EPPO*. - 1995. - № 25. - P. 283 – 287.
6. Martelli G. P., Graniti A., Ercolani G. L. Nature and physiological effects of grape vine diseases // *Experientia*. - 1986. - № 42. - P. 933 – 942.
7. Maladies a virus et affections similaires de la vigne / Bovey R., Hewitt W. B., Martelli G. P. // Payot, La Maison Rustique. – Stuttgart, 1980. – 153 p.
8. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses / Rowhani A., Biardi L., Johnson R. et al. // 13th ICVG Conference (Adelaide, 12 – 17th March, 2000): Abstracts. - Adelaide, 2000. – P. 148.
9. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of Grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines / Fattouch S., M'Hirsi S., Acheche H., Marrakchi M., and Marzouki N. // *Plant Mol. Biol. Rep.* –2001. – № 19. – P. 235-244.

Выявление вируса короткоузлия винограда в процессе производства сертифицированного посадочного материала

А.І. Конуп

Обследованы базовые и сертифицированные насаждения маточек винограда в хозяйствах Одесской области. Использована методика идентификации вирусной болезни - короткоузлия винограда (GFLV) Ранняя диагностика короткоузлия винограда методом полимеразной цепной реакции позволяет быстро определить качество посадочного материала винограда. Выявлены виноградные растения с симптомами и в латентной форме вирусной болезни.

Ключевые слова: виноград, вирусы винограда, полимеразная цепная реакция, идентификация.

Identification of grapevine fleck virus in the process of production of the certificated planting-stock

A. Konup

The base and certificated planting of utricle of vine is inspected in the economies of the Odesa area. Methodology of identification of virosis is used - to the grapevine fleck virus (GFLV) Early diagnostics of grapevine fleck virus of vine allows quickly to define quality of plant material of vine the method of polymerase chain reaction. Vine plants are educed with symptoms and in the latent form of virosis of vine.

Key words: vine, viruses of vine, polymerase chain reaction, identification