

**ВОЗМОЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА
КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ МАЛИНЫ (RBDV)
У РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ МАЛИНЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*
МЕТОДОМ DAS-ELISA ТЕСТА**

Е. В. КОЛБАНОВА, Т. Н. БОЖИДАЙ

*Республиканское унитарное предприятие «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: kolbanova@tut.by*

АННОТАЦИЯ

В ходе исследований установлено, что вирус кустистой карликовости малины (RBDV) можно диагностировать у растений-регенерантов малины в культуре *in vitro* методом DAS-ELISA теста, не получая ложноотрицательный результат. Из 14 растений 5 клонов малины сорта Heritage, адаптированных *ex vitro*, вирус RBDV был диагностирован у растения одного клона как на стадии *in vitro*, так и на стадии адаптации через 1,5 и 5,5 месяцев после высадки в нестерильные условия. Тестирование оставшихся 54 клонов в культуре *in vitro* выявило еще 17 клонов малины, зараженных вирусом RBDV, что позволило исключить их из процесса микроразмножения. У зараженных образцов оптическая плотность превышала оптическую плотность отрицательного контроля в 18–28 раз.

Ключевые слова: RBDV, DAS-ELISA тест, *in vitro*, малина, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV) является одним из наиболее распространенных вирусных заболеваний малины. Также вирус обнаруживался в ряде других видов, относящихся к роду *Rubus* L. [1–3]. Вирус распространен повсеместно [4] и был выявлен на территории Беларуси [5].

У восприимчивых сортов малины вирус вызывает заболевание, характеризующееся пожелтением областей между жилками листьев. Эти области могут сливаться с образованием колец или линейных рисунков, может наблюдаться и полное пожелтение листа. Часто вирус бессимптомен на растениях рода *Rubus* L. В смешанных инфекциях вирусов, переносимых тлями, у малины отмечается уменьшение жизнеспособности, а у некоторых сортов – измельчение и рассыпание ягод. При этом количество ягод, как правило, не уменьшается, а урожайность снижается до 50 % и более за счет уменьшения веса ягоды и количества костянок в ней [6].

В соответствии с нормативными документами Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO) RBDV подлежит контролю и не допускается при производстве сертифицированного посадочного материала растений рода *Rubus* L. [7].

Для диагностики RBDV наиболее простым и быстрым методом является использование иммуноферментного анализа [6, 7], также разработаны такие методы, как RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) [8], IC-RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и адсорбцией РНК вируса с помощью антител) [9, 10], RFLP (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) [11].

Ряд исследователей для диагностики вирусных патогенов методом иммуноферментного анализа с целью непрерывного фитосанитарного контроля [12, 13], а в некоторых случаях и увеличения чувствительности метода [14], рекомендуют использовать растения-регенеранты *in vitro*. Для RBDV данного рода исследования не проводились.

Цель исследования – установить возможность определения вируса кустистой карликовости малины у растений-регенерантов малины в культуре *in vitro* методом DAS-ELISA теста.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в 2016–2018 гг. в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Объект исследований: малина ремонтантная сорта Heritage.

В 2016 г. в культуру *in vitro* были введены крупные экспланты (точка роста 1–2 мм) из почек однолетних побегов малины, находящихся в состоянии покоя (октябрь – ноябрь). Маточные растения, побеги которых использовались для введения, предварительно не тестировались на наличие вируса кустистой карликовости малины (RBDV). На 1-м пассаже было получено 113 клонов. После стабилизации культуры, на 3-м пассаже сохранилось 59 клонов.

Растения-регенеранты *in vitro* (8-й пассаж) и адаптированные *ex vitro* растения-регенеранты малины ремонтантной сорта Heritage тестировали на наличие RBDV DAS-ELISA тестом с применением реактивов фирмы Bioreba (Франция).

Специфические антитела разводили в покровном буфере в соотношении 1:1000 и вносили их в лунки микроплат по 200 мкл, которые затем инкубировали 4 часа при 30 °С. После этого проводили трехкратную промывку промывающим буфером при помощи вошера PW 40 (Bio-Rad, США).

Гомогенизацию растительного материала проводили в индивидуальном пластиковом пакете с добавлением экстрагирующего буфера в соотношении 1:10. В лунки микроплат вносили экстракт каждого тестируемого образца (по 200 мкл) и инкубировали при температуре +4 °С в течение ночи. После этого осуществляли трехкратную промывку с помощью вошера.

Разведенные в конъюгирующем буфере конъюгирующие антитела в соотношении 1:1000 вносили в лунки микроплат по 200 мкл и инкубировали 5 часа при 30 °С, затем проводили трехкратную промывку.

Р-нитрофенилфосфат, растворенный в субстратном буфере, вносили в лунки микроплат и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение часа.

Регистрация результатов велась на автоматическом ридере Mark™ Microplate Reader (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Сравнивали показатели оптической плотности анализируемых образцов (Ао) с показателями оптической плотности отрицательного контроля (Ак). Положительными считали образцы, значение оптической плотности у которых превышало среднюю оптическую плотность отрицательного контроля больше чем в 2 раза. Повторность анализа каждого образца двукратная. Для каждой отдельной микроплат был положительный и отрицательный контроль.

Растения-регенеранты *in vitro* и адаптированные *ex vitro* растения-регенеранты малины находились в следующих условиях: освещение (лампы NARVALT, 36 W) 2,5–3 тыс. люкс, температура +22...+24 °С, фотопериод 16/8 часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус кустистой карликовости малины является широко распространенным в насаждениях малины как летней, так и ремонтантной, при этом наносит значимый экономический ущерб, снижая урожайность и качество ягод малины. Поэтому введение в культуру *in vitro* сортов малины требует предварительного тестирования на этот вирус побегов малины, с которых собираются брать экспланты для введения. Это позволит избежать дальнейшего размножения в культуре *in vitro* и адаптации *ex vitro* растений-регенерантов, а также посадки в полевые условия растений малины, зараженных вирусом RBDV.

Наши исследования были направлены на выяснение возможности тестирования растений малины на наличие/отсутствие вируса RBDV на стадии размножения *in vitro*, если предварительное тестирование не было проведено в силу каких-то причин (например, упущены сроки оптимального тестирования в полевых условиях, необходимость введения в культуру эксплантов с единичных черенков, полученных в результате научного обмена между научно-исследовательскими институтами и т. д.).

Исследования показали, что вирус RBDV можно диагностировать у растений-регенерантов малины в культуре *in vitro* методом DAS-ELISA теста, не получая ложноотрицательный результат. Поскольку растения малины сорта Heritage оказались трудно размножаемыми в культуре *in vitro*, микропобеги, готовые к укоренению (т. е. высотой более 2 см), были получены только к 7-му пассажу. Количество адаптированных *ex vitro* растений составило 14 штук пяти клонов № 1,

4, 26, 50, 58. При тестировании этих адаптированных растений через 1,5 месяца после высадки в нестерильные условия вирус RBDV был выявлен у одного растения (клон № 50). Повторное тестирование этих же растений через 5,5 месяцев после высадки в нестерильные условия подтвердило наличие вируса только у растения клона № 50. Тестирование растений-регенерантов *in vitro* этих же клонов на 8-м пассаже также показало наличие вируса RBDV у клона № 50. При этом следует отметить, что оптическая плотность тестируемого образца (клон № 50) как в культуре *in vitro*, так и на стадии адаптации (через 1,5 и 5,5 месяцев) превышала оптическую плотность отрицательного контроля более чем в 27 раз (таблица 1).

Таблица 1 – Значения оптической плотности, полученные в результате тестирования образцов малины сорта Heritage методом иммуноферментного анализа (DAS-ELISA тест)

Клон	Растения-регенеранты <i>in vitro</i> (8-й пассаж)			Адаптированные растения					
	Ао	1,5 месяца		5,5 месяцев				Ак	Ао/Ак
		Ак	Ао/Ак	Ао	Ак	Ао/Ак	Ао		
1	0,126	0,124	1,016	0,116	0,124	0,935	0,117	0,120	0,975
1	0,124	0,124	1,000	0,118	0,124	0,952	0,119	0,120	0,992
1	0,122	0,124	0,984	0,115	0,124	0,927	0,118	0,120	0,983
4	0,122	0,124	0,984	0,116	0,124	0,935	0,115	0,120	0,958
26	0,116	0,124	0,935	0,114	0,124	0,919	0,120	0,120	1,000
26	0,115	0,124	0,927	0,115	0,124	0,927	0,114	0,120	0,950
26	0,114	0,124	0,919	0,114	0,124	0,919	0,115	0,120	0,958
26	0,116	0,124	0,935	0,115	0,124	0,927	0,117	0,120	0,975
50	3,480	0,124	28,065	3,488	0,124	28,129	3,266	0,118	27,678
58	0,119	0,124	0,960	0,116	0,124	0,935	0,122	0,118	1,034
58	0,117	0,124	0,944	0,114	0,124	0,919	0,118	0,118	1,000
58	0,118	0,124	0,952	0,113	0,124	0,911	0,120	0,120	1,000
58	0,119	0,124	0,960	0,117	0,124	0,944	0,119	0,120	0,992
58	0,116	0,124	0,935	0,125	0,124	1,008	0,113	0,120	0,942

Далее были протестированы оставшиеся 54 клона растений-регенерантов *in vitro*, чтобы исключить зараженные вирусом RBDV растения малины из процесса микроразмножения и не допустить их к стадии адаптации *ex vitro*. Из 54 клонов зараженными оказались 17 клонов, при этом их оптическая плотность превышала оптическую плотность отрицательного контроля в 18–28 раз (таблица 2).

Таблица 2 – Значения оптической плотности, полученные в результате тестирования образцов растений-регенерантов *in vitro* малины сорта Heritage методом иммуноферментного анализа (DAS-ELISA тест)

Клон	Растения-регенеранты <i>in vitro</i> (8-й пассаж)		
	Ао	Ак	Ао/Ак
3	3,500	0,124	28,226
6	0,118	0,124	0,952
7	0,123	0,124	0,992
8	3,421	0,124	27,589
11	3,500	0,124	28,226
12	0,119	0,124	0,960
13	3,474	0,124	28,016
14	0,120	0,124	0,968
15	0,114	0,124	0,919
17	3,496	0,124	28,194
19	0,115	0,124	0,927
21	3,500	0,124	28,226
23	0,116	0,124	0,935

Клон	Растения-регенеранты <i>in vitro</i> (8-й пассаж)		
	Ао	Ак	Ао/Ак
24	0,116	0,124	0,935
29	0,119	0,124	0,960
30	3,436	0,124	27,710
35	2,976	0,124	24,000
36	0,120	0,124	0,968
38	0,121	0,124	0,976
39	0,116	0,124	0,935
41	0,113	0,124	0,911
43	0,113	0,124	0,911
44	0,115	0,124	0,927
46	0,131	0,132	0,992
47	2,990	0,124	24,113
48	3,500	0,124	28,226
51	0,118	0,124	0,952
52	0,115	0,124	0,927
60	0,111	0,124	0,895
61	2,446	0,132	18,530
62	3,143	0,124	25,347
63	2,703	0,132	20,477
65	0,130	0,132	0,985
66	0,130	0,132	0,985
72	2,600	0,132	19,697
74	0,124	0,132	0,939
75	0,123	0,132	0,932
80	0,125	0,132	0,947
81	0,124	0,132	0,939
82	0,126	0,132	0,955
86	0,125	0,132	0,947
89	0,124	0,132	0,939
90	0,126	0,132	0,955
91	2,430	0,132	18,409
92	0,125	0,132	0,947
93	2,459	0,132	18,629
95	0,128	0,132	0,970
96	0,125	0,132	0,947
98	0,123	0,132	0,932
99	0,123	0,132	0,932
108	0,123	0,132	0,932
109	0,121	0,132	0,917
112	0,122	0,132	0,924
113	2,572	0,132	19,485

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что вирус RBDV можно диагностировать у растений-регенерантов малины в культуре *in vitro* методом DAS-ELISA теста, не получая ложноотрицательный результат. Из 14 растений 5 клонов малины сорта Heritage, адаптированных *ex vitro*, вирус RBDV был диагностирован у растения одного клона как на стадии *in vitro*, так и на стадии адаптации через 1,5 и 5,5 месяцев после высадки в нестерильные условия. Тестирование оставшихся 54 клонов в культуре

in vitro выявило еще 17 клонов малины, зараженных вирусом RBDV, что позволило исключить зараженные вирусом RBDV клоны растений малины из процесса микроразмножения и не допустить их к стадии адаптации *ex vitro*. У зараженных образцов оптическая плотность превышала оптическую плотность отрицательного контроля в 18–28 раз.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Occurrence and distribution of Raspberry bushy dwarf virus in commercial plantations in England and Wales / D. J. Barbara [et al.] // Plant Pathology. – 2001. – Vol. 50. – P. 747–754.
2. New host for Raspberry bushy dwarf virus: arctic bramble (*Rubus arcticus*) / H. Kokko [et al.] // Europe Journal of Plant Pathology. – 1996. – Vol. 102, № 7. – P. 713–717.
3. Strik, B. Impact of Raspberry bushy dwarf virus on 'Marion' blackberry / B. Strik, R. R. Martin // Plant Disease. – 2003. – Vol. 87, № 3. – P. 294–296.
4. Converse, R. H. Diseases caused by virus and virus-like agents / R. H. Converse // Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects / M. A. Ellis [et al.]. – St. Paul, 1991. – P. 42–58.
5. Волосевич, Н. Н. Оздоровление и размножение сортов малины на основе фитосанитарного мониторинга вирусов и культуры тканей *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Н. Н. Волосевич; Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2011. – 21 с.
6. Кухарчик, Н. В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н. В. Кухарчик. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 209 с.
7. Certification scheme for *Rubus*. EPPO Standards PM 4/10 (2) // Bulletin OEPP/EPPO. – 2009. – Vol. 39. – P. 271–277.
8. Волосевич, Н. Н. Диагностика вируса кустистой карликовости малины (RBDV) методом RT-PCR / Н. Н. Волосевич, Н. В. Кухарчик // Земляробства і ахова раслін. – 2010. – № 6. – С. 4–6.
9. Kokko, H. I. Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of Raspberry Bushy Dwarf Virus / H. I. Kokko, M. Kivineva, S. O. Karenlampi // Biotechniques. – 1996. – Vol. 20, № 5. – P. 842–846.
10. Методика диагностики основных вирусных инфекций плодовых и ягодных культур / Н. В. Кухарчик [и др.]. – Минск: А. Н. Вараксин, 2015. – 32 с.
11. Rapid differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis / D. J. Barbara [et al.] // Journal of Virological Methods. – 1995. – Vol. 55. – P. 121–131.
12. Detection of the phytosanitary status of stone fruit cultivars under *in vitro* conditions in Hungary / I. Balla [et al.] // Plant Protection Science. – 2002. – Vol. 38 (Special Issue 2). – P. 271–274.
13. Detection of important plant viruses in *in vitro* regenerated potato plants by double antibody sandwich method of ELISA / S.A. Khan [et al.] // Plant Tissue Culture. – 2003. – Vol. 13. – P. 21–29.
14. Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown *in vitro* and the use of immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction improve the detection of Prunus necrotic ringspot virus in rose / B. Moury [et al.] // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90, № 5. – P. 522–528.

THE POSSIBILITY OF DETECTION OF RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS (RBDV) IN MICROSHOOTS OF RASPBERRY PLANTS IN CULTURE *IN VITRO* BY DAS-ELISA

E. V. KOLBANOVA, T. N. BOZHIDAY

Sammury

It was established that *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) can be detected in *in vitro*-derived shoots of raspberry by DAS-ELISA test (without a false negative results). RBDV was detected in one clone of raspberry cv. Heritage (out of 14 plants 5 clones) both in the *in vitro* and adaptation stages (at 1.5 and 5.5 months after planted in non-sterile conditions). In addition, seventeen clones (out of other 54 clones) of raspberry plants (*in vitro* shoots) were found infected with RBDV. This made it possible to exclude virus-infected clones of raspberry plants from the micropropagation process. The optical density of samples with RBDV exceeded the optical density of the negative control by 18–28 times.

Keywords: RBDV, DAS-ELISA, *in vitro*, raspberry, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 28.03.2018