

УДК 634.2:632.38:58.083.24

## РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ДИАГНОСТИКИ БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ ЛАБОРАТОРНЫМИ МЕТОДАМИ

**Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая, Е.В. Колбанова, О.В. Соловей, Н.Н. Волосевич**  
РУП «Институт плодоводства»,  
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,  
e-mail: Kuchnataly@rambler.ru

### РЕЗЮМЕ

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2011–2012 гг. Предварительную визуальную диагностику вируса Шарки сливы проводили в насаждениях косточковых культур (слива, алыча, вишня, черешня) в период вегетации: в конце весны – начале лета. Оценена результативность диагностики белорусских изолятов вируса Шарки сливы с помощью ряда лабораторных методов, в том числе с использованием поликлональных, рекомбинантных и моноклональных универсальных антител для иммуноферментного анализа и метода IC-RT-PCR.

Показано, что поликлональные антитела более эффективны для массовой диагностики белорусских изолятов вируса Шарки, чем моноклональные универсальные антитела.

В то же время вариант ИФА с использованием поликлональных антител наименее чувствительный, максимальное разведение, при котором было возможно определить наличие данного вируса в тканях растения, не превышает 1:20. Использование моноклональных и рекомбинантных антител в ИФА-тесте позволило определить вирус в образцах, разведенных до 1:100, метод IC-RT-PCR – при разведении экстрактов до 1:50000.

Ключевые слова: вирус Шарки сливы, изолят, иммуноферментный анализ, метод IC-RT-PCR, Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

Шарка сливы (оспа) вызывается потивирусом *Plum pox potyvirus (PPV)* и относится к карантинным, либо особо опасным заболеваниям косточковых во многих странах мира. Вирус Шарки сливы встречается в 29 странах Европы и 52 странах мира и является крайне опасным для видов *Prunus*, включая абрикос, персик, сливу, алычу [1–7], в меньшей степени миндаль. Шарка диагностируется на вишне, однако, до сих пор заражение это считается редким и мало изученным явлением. PPV инфицирует большую часть диких и декоративных видов *Prunus*, таких как *P. blireiana*, *P. brigantina*, *P. cerasifera*, *P. cistena*, *P. glandulosa*, *P. holosericea*, *P. hortulana*, *P. japonica*, *P. kurdina*, *P. mandschurica*, *P. maritima*, *P. tume*, *P. nigra*, *P. pumila*, *P. sibirica*, *P. simonii*, *P. spinosa*, *P. tomentosa*, *P. triloba* и их гибриды [2].

Восприимчивые виды рода *Prunus* широко используются в плодоводстве (сорта и подвои) по всей Европе. Дикае древесные виды рода *Prunus* семейства розоцветных и многие травянистые растения, названные выше, встречаются в Беларуси и являются потенциальными резерваторами болезни.

В результате проведенной в предыдущие годы диагностики вируса Шарки в нашей стране, вирус обнаружен в 5 областях из 6. В данный момент этот вирус не включен в списки карантинных объектов А1 и А2 Беларуси.

Широкое распространение и вредоносность вируса Шарки обусловили его использование в качестве модельного объекта, поэтому данный вирус и методы его идентификации достаточно хорошо изучены. Согласно Протоколу по диагностике карантинного организма – вируса Шарки, разработанному Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений (ЕРРО), в настоящее время для идентификации вируса могут использоваться следующие методы: ELISA-тест (прямой и непрямой), молекулярные тесты (IC-RT-PCR и RT-PCR), биологическое тестирование, а также методы, основанные на электронной микроскопии и иммуно-электронной микроскопии [4, 8, 9].

Целью данных исследований было оценить результативность диагностики белорусских изолятов вируса Шарки сливы с помощью ряда лабораторных методов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Визуальную диагностику вируса Шарки сливы** проводили в насаждениях косточковых культур (слива, алыча, вишня, черешня) в период вегетации: в конце весны – начале лета. Наличие симптомов оценивали как на листьях, так и на плодах. В небольших насаждениях и приусадебных участках осматривали каждое растение, в насаждениях более 3 га – 20 % растений. В многосортных насаждениях осматривали все сорта отдельно. В маточно-черенковых насаждениях и маточниках клоновых подвоев осматривали каждое индивидуальное растение. Обследование не проводили в условиях экстремально жаркой погоды, а также в течение двух недель после длительного периода температур выше 25 °С.

Для проведения иммуноферментного анализа отбирали листья весной и в начале лета, в первую очередь, с визуальными симптомами, поврежденные вредителями, морфологически аномальные. При отсутствии симптомов листья отбирали с разных сторон кроны. Образцы хранили не более 7 дней при температуре +4 °С.

### **ИФА диагностику РРV проводили по следующей схеме:**

1. Специфические антитела разводили в покровном буфере в соответствии с инструкцией производителя и по 100 мкл вносили в лунки микроплат. Инкубирование микроплат проводили при температуре +37 °С, с последующей трехкратной промывкой промывающим буфером в вошере РW 40.

2. Взвешивали по 0,3 г каждого образца и гомогенизировали в индивидуальном пластиковом пакете с добавлением экстрагирующего буфера. В лунки микроплат вносили экстракт каждого тестируемого образца по 100 мкл в двукратной повторности и инкубировали в течение ночи при температуре +4 °С. Затем промывали буфером с помощью вошера РW 40.

3. Разведенные в конъюгатном буфере антитела вносили по 100 мкл в лунки микроплат. После инкубирования, которое проводили при температуре +37 °С в течение 2 часов, осуществляли трехкратную промывку.

4. Разведенные в конъюгатном буфере антивидовые конъюгирующие антитела с алколиновой фосфатазой вносили по 100 мкл в лунки микроплат. После инкубирования, которое проводили при температуре +37 °С в течение 2 часов, осуществляли трехкратную промывку.

5. Для превращения иммунной реакции в видимую р-нитрофенилфосфат, растворенный в субстратном буфере, вносили в каждую лунку по 100 мкл. Микроплаты инкубировали при +37 °С.

6. Считывание и регистрацию результатов проводили через 1 и 2 часа после инкубирования на автоматическом ридере PR 2100 («Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc.», Франция) при длине волны 405 нм (A405). Сравнивали показатели оптической плотности анализируемых образцов (A0) с показателями оптической плотности отрицательного контроля (Ак). Образцы, значение оптической плотности у которых превышало на 50 % и более среднюю оптическую плотность отрицательного контроля ( $A0 \geq A_k + 50\%$ ), считали положительными. Десятикратное превышение положительного контроля над отрицательным контролем давало основание судить о достоверности результатов тестирования. Повторность анализа для каждого образца двукратная.

**Методика проведения ПЦР-анализа.** В ПЦР пробирки объемом 200 мкл вносили 110 мкл раствора антител (растворенных в покровном буфере) и инкубировали при +37 °С в течение 3 часов. Пробирки трижды промывали 140 мкл PBS-T буфера. Далее в пробирки помещали растительные экстракты (1:20, в PBS-TPO буфере, по 100 мкл экстракта пробирку) и инкубировали в течение ночи при температуре +4 °С.

После инкубирования пробирки промывали четыре раза с использованием PBS-T буфера (по 140 мкл) и один раз 0,01 М Tris/Cl буфера (по 170 мкл) pH 8,0 с последующим центрифугированием (+4 °С, 10000 оборотов в минуту, 2 мин) и тщательным удалением оставшегося промывочного раствора.

Для проведения ПЦР-реакций использовали набор Titan One Step RT-PCR (Roche) и амплификатор iCycler (BIO-Rad, USA). Праймеры, использованные для диагностики вируса Шарки, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для определения вируса Шарки, использованные в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Температура отжига	Размер ПЦР продукта	Источник
PPV-P1	accgagaccactacactccc	+62 °С	243 пн	Wetzel <i>et al.</i> , (1991)
PPV-P2	cagactacagcctcgccaga			

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Визуальная диагностика.** Шарка сливы относится к разряду патогенов, имеющих характерные внешние проявления (рисунки 1, 2). На листьях инфицированных растений сливы появляется нерегулярное осветление жилок молодых листьев, дуболистный узор, окружающий главную и вторичные жилки, в некоторых случаях диффузная, бледная или зеленая пятнистость, хлоротические пятна и ленточные узоры. Со временем общая хлоротическая пятнистость листьев перерастает в некротическую пятнистость. Листья деформируются и становятся ассиметричными.

Симптомы на листьях алычи имеют вид пятен, колец и полос различной формы. На плодах в большинстве случаев некрозы и деформация отсутствуют, но могут и проявиться в виде отдельных вдавленных пятен и колец.

Симптомы на вишне сходны с симптомами на сливе, но пятна на листьях более мелкие и достаточно четкие.

В то же время значительная часть описанных симптомов характерна и для других вирусов, а также может являться признаком физиологических нарушений. Для определения возможности визуальной диагностики вируса Шарки отобрано 239 образцов рода *Prunus* L. с визуальными симптомами заражения вирусом Шарки и около 1000 растений без видимых симптомов повреждения вирусами (сорта сливы, алычи, вишни, черешни, семенные и клоновые подвои для косточковых культур).



Рисунок 1 – Поражение листьев сливы вирусом PPV (пятна, полосы, кольца).



Рисунок 2 – Поражение листьев сливы вирусом PPV (деформация листьев).

Проведено лабораторное тестирование с использованием ИФА-анализа, в результате которого подтверждено наличие вируса Шарки у 67 образцов *Prunus L.*, имеющих визуальные симптомы, что составляет 28,03 % от общего числа отобранных [10–12].

Среди растений без видимых симптомов поражения вирусом Шарки патоген диагностировался в различные годы в единичных образцах.

Таким образом, визуальные симптомы вируса Шарки не могут достоверно свидетельствовать о его наличии, поскольку только у 28,03 % образцов, имеющих визуальные симптомы, подтверждено наличие вируса методом ИФА и ПЦР-анализа.

### Сравнение результативности использования поликлональных и моноклональных антител в ходе ИФА для определения белорусских изолятов вируса Шарки

Для диагностики вирусов растений методом ИФА могут быть использованы как моноклональные, так и поликлональные антитела. Следует отметить, что эффективность использования тех или иных антител будет разной в зависимости от патогена и его серологических свойств. Поскольку до настоящего времени подобных исследований применительно к белорусским изолятам вируса Шарки не проводилось, то представляло интерес оценить какой тип антител наиболее эффективен для массового тестирования растений косточковых культур на наличие вируса PPV методом ИФА.

Поликлональные (PAb) и универсальные моноклональные (PPV-Un MAbs) антитела к вирусу Шарки были любезно предоставлены д-ром Т. Малиновским из лаборатории биохимии и физиологии растений Научно-исследовательского института садоводства (Скерневицы, Польша). В качестве положительных контролей использовали положительный контроль из ИФА-набора фирмы Sediag для диагностики вируса Шарки, а также листья инфицированного Res-штаммом вируса растения сливы.

Сорта, формы и подвои вишни и черешни были протестированы ИФА с использованием различных антител. В таблице 2 представлены результаты тестирования, которые показывают, что поликлональные антитела выявили вирус Шарки в растениях дикой черешни, сорте вишни Облачинская, подвое Измайловский, в которых использование моноклональных антител показало отсутствие вируса. У образца № 48 показана более высокая концентрация вируса при использовании поликлональных антител, что может быть определено наличием у образца нескольких штаммов вируса.

Таблица 2 – Сравнение результативности использования моноклональных и поликлональных антител для определения вируса Шарки

№	Сорт/сортобразец	PPV-Un Mabs	PAb
8 Контроль	К- (здоровое растение абрикоса)	-	-
11 Контроль	К+ (ИФА набор Sediag)	++++	++++
15 Контроль	К+ (PPV-Res штамм)	+++	+++
1	Л2	+	+
18	ВЦ 8-101	+++	+++
41	Л2	+	+
47	Л2	++	++
48	Л2	++	+++
49	Л2	+++	+++
50	Л2	++	+
54	Л2	+++	+++
55	Л2	+++	+++
67	Облачинская	-	++
76	Дикая черешня	-	++
77	Дикая черешня	-	+++
81	ОВП-6	+++	+++
85	Измайловский	-	++
86	Измайловский	-	+++
89	Л2	+	+

Примечание: «+» – положительный результат; «-» – отрицательный результат.

Таким образом, наличие в садах косточковых культур на территории Беларуси нескольких изолятов вируса Шарки сливы обуславливает необходимость при массовом

тестировании насаждений использовать для иммуноферментного анализа поликлональные антитела, которые позволили определить большее количество изолятов вируса Шарки, чем моноклональные универсальные антитела.

### Сравнение чувствительности методов ИФА и ПЦР для диагностики вируса Шарки сливы

Для оценки чувствительности нескольких вариантов иммуноферментного анализа и ПЦР-анализа при диагностике наличия вируса PPV в растительных тканях готовили серию разведений экстрактов (от 1:10 до 1:50000) из растения *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*-PPV), предварительно зараженного вирусом Шарки сливы. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт здорового растения *N. benthamiana* healthy в разведении 1:20, положительного контроля – *N. benthamiana*-PPV в разведении 1:20. Полученные экстракты были тестированы тремя вариантами иммуноферментного анализа: с использованием моноклональных антител (MAb), поликлональных антител (PAb) и рекомбинантных антител F(ab')<sub>2</sub>.

В результате исследований было показано, что наименее чувствительным вариантом ИФА был метод с использованием поликлональных антител, поскольку максимальное разведение, при котором было возможно определить наличие вируса Шарки сливы в тканях растения, не превышало 1:20 (таблица 3). Следует отметить, что использование моноклональных и рекомбинантных антител в ИФА-тесте позволило определить вирус в образцах, разведенных до 1:100.

Таблица 3 – Иммуноферментная диагностика вируса Шарки сливы с использованием различных антител

Образец PPV и его разведение	Варианты иммуноферментного анализа		
	DAS-Elisa MAb	DAS-Elisa PAb	F(ab') <sub>2</sub>
<i>N. benthamiana</i> healthy (K-)	-	-	-
<i>N. benthamiana</i> PPV 1:20 (K+)	+	+	+
<i>N. benthamiana</i> PPV 1:10	+	+	+
<i>N. benthamiana</i> PPV 1:100	+	-	+
<i>N. benthamiana</i> PPV 1:1000	-	-	-
<i>N. benthamiana</i> PPV 1:10000	-	-	-
<i>N. benthamiana</i> PPV 1:50000	-	-	-

Данные экстракты были тестированы также методом IC-RT-PCR с праймерами PPV-P1/PPV-P2 (рисунок 3).

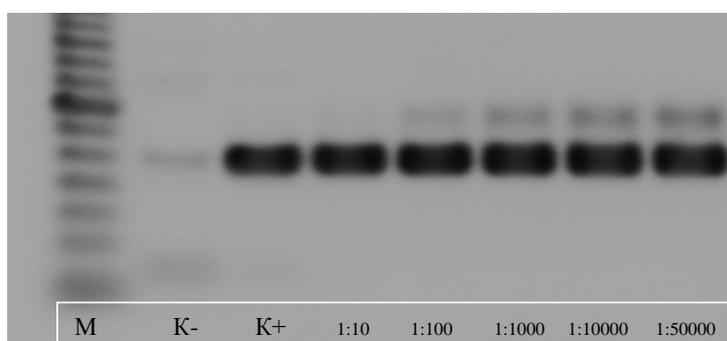


Рисунок 3 – Определение PPV вируса методом IC-RT-PCR в разведенных экстрактах.

Установлено, что использование метода IC-RT-PCR позволяло определять наличие вируса PPV даже при разведении экстрактов до 1:50000.

## ВЫВОДЫ

Установлено, что визуальные симптомы не могут достоверно свидетельствовать о наличии вируса Шарки в растении, поскольку только у 28,03 % образцов, имеющих визуальные симптомы, было подтверждено наличие вируса методом ИФА.

Показано, что поликлональные антитела более эффективны для массовой диагностики белорусских изолятов вируса Шарки, чем моноклональные универсальные антитела.

В то же время вариант ИФА с использованием поликлональных антител наименее чувствительный, максимальное разведение, при котором было возможно определить наличие данного вируса в тканях растения, не превышает 1:20. Использование моноклональных и рекомбинантных антител в ИФА-тесте позволило определить вирус в образцах, разведенных до 1:100, метод IC-RT-PCR – при разведении экстрактов до 1:50000.

## Литература

1. OEPP/EPPO. Data sheets on quarantine organisms N 96: Plum pox virus // Bulletin OEPP/EPPO. – 1983. – Vol. 13. – P. 1.
2. OEPP/EPPO. Specific quarantine requirements. Plum pox potyvirus. Inspection and test procedures // Bulletin OEPP/EPPO. – 1990. – Vol. 94. – P. 267-278.
3. OEPP/EPPO. Quarantine Procedure N 43. Plum pox potyvirus – inspection and test methods // Bulletin OEPP/EPPO. – 1992. – Vol. 22. – P. 239-242.
4. EPPO/OEPP. SMT Project SMT-4-CT98-2252 (Протокол диагностики карантинного организма - PPV) // Bulletin OEPP/EPPO. – 2002. – N 34. – P. 155-157.
5. Quarantine Pests for Europe. Data sheets on Quarantine Pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Prepared by CAB International and EPPO for EC [Electronic resource]. – 1992. – Mode of access: [https://www.eppo.int/.../virus/Plum\\_pox\\_virus/PPV000\\_ds.pdf](https://www.eppo.int/.../virus/Plum_pox_virus/PPV000_ds.pdf). – Date of access: 20.02.2014.
6. Quarantine Pests for Europe. Data sheets on Quarantine Pests for European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Prepared by CAB International and EPPO for EC [Electronic resource]. – 1997. – Mode of access: [www.eppo.int/.../virus/Plum\\_pox\\_virus/pm7-32\(1\)%20PPV000%20web.pdf](http://www.eppo.int/.../virus/Plum_pox_virus/pm7-32(1)%20PPV000%20web.pdf). – Date of access: 12.02.2014.
7. Nemeth, M. History and importance of plum pox in stone-fruit production / M. Nemeth // EPPO Bull. – 1994. – N 24. – P. 525-526.
8. Dunez, J. Plum pox virus / J. Dunez, D. Sutin // European Handbook of plant disease. – Blackwell, London, 1988. – P. 44-46.
9. Kerlan, C. Some properties of plum pox virus and its nucleic acid and protein components / C. Kerlan, J. Dunez // Acta Hort. – 1976. – N 67. – P. 185-192.
10. Salavei, A. Detection of plum pox virus in regions of Belarus / A. Salavei [et al.] // 22<sup>nd</sup> “International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops”, Rome, 5-8 Jun 2012 / ICVF; Scientific Committee: W. Jelkmann [et al.]. – Rome, 2012. – P. 152.
11. Malinowski, T. Partial characterisation of biological properties of PPV-C isolates found in Belarus and establishment of in vitro cultures of infected L2 and OWP-6 rootstocks / T. Malinowski [et al.] // 22<sup>nd</sup> “International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops”, Rome, 5-8 Jun 2012 / ICVF; Scientific Committee: W. Jelkmann [et al.]. – Rome, 2012. – P. 149.
12. Salavei, A.V. Sanitary status of Sharka on Stone fruit trees in Belarus / A.V. Salavei, N.V. Kukharchyk, T. Malinowski // International symposium on Plum pox virus, Sofia, September 5-9, 2010, Bulgaria. – Sofia, 2010. – P. 39.

## **DIAGNOSIS EFFICIENCY OF BELARUSIN ISOLATES OF PLUM POX VIRUS IN LABORATORY**

N.V. Kukharchik, M.S. Kastritskaya, E.V. Kolbanova, O.V. Solovej, N.V. Volosevich

### **RESUME**

The investigations were made within 2011-2012 in the department of biotechnology of the Institute for Fruit Growing. Preliminary visual diagnosis of plum pox virus made at the plantations of stone fruit crops such as plum, cherry plum, sour cherry and sweet cherry ones during their vegetation, i.e. in the end of spring and in the beginning of summer. Diagnosis efficiency of Belarusian isolates of plum pox virus by means of a number of laboratory methods, including use of polyclonal, recombinant and monoclonal universal antibodies for enzyme immunoassay and IC-RT-PCR method was estimated.

It is shown, that polyclonal antibodies are more effective for mass diagnosis of Belarusian isolates of plum pox virus, than monoclonal universal antibodies.

At the same time the variant of enzyme immunoassay with use of polyclonal antibodies is the least sensitive. The maximum dilution, at which it has been possible to define the presence of the given virus in plant tissues, does not exceed 1:20. The use of monoclonal and recombinant antibodies in the enzyme immunoassay allowed defining the virus in the samples diluted up to 1:100 and at the IC-RT-PCR method it became possible at dilution of extracts up to 1:50000.

Key words: plum pox virus, isolate, enzyme immunoassay, IC-RT-PCR method, Belarus.

*Дата поступления статьи в редакцию 21.02.2014*