

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИФА И ПЦР-АНАЛИЗА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ *RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS* (RBDV) У РАСТЕНИЙ МАЛИНЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

О. А. ГАШЕНКО, Т. Н. БОЖИДАЙ, Е. В. КОЛБАНОВА, Н. В. КУХАРЧИК

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@belsad.by

АННОТАЦИЯ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2022–2023 гг. на сортах малины летней (Метеор, Laszka) и ремонтантной (Похвалинка, Малиновая гряда, Карамелька, Брянское диво), зараженных *Raspberry bushy dwarf virus*. Экспланты для введения в культуру *in vitro* малины необходимо брать с кустов, предварительно протестированных методом ИФА или ПЦР на отсутствие RBDV, так как культура *in vitro* не освобождает растения от данного патогена. Для снижения объемов тестов ИФА и ПЦР-анализа необходимо регистрировать введенные меристемы и растения-регенеранты, полученные из каждой меристемы как в культуре *in vitro*, так и *ex vitro*. Наличие/отсутствие RBDV у растений-регенерантов в культуре *in vitro* можно определять как с помощью ИФА, так и ПЦР.

Исследования проведены в рамках договора с БРФФИ № Б22МЛДГ-007 от 1 апреля 2022 г., задания «Разработка биотехнологических способов (*in vitro* и *ex vitro*) оздоровления от вируса кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*) с целью увеличения продуктивности промышленных насаждений малины» (2022–2023 гг.).

Ключевые слова: малина, культура *in vitro*, вирус кустистой карликовости малины (RBDV), DAS-ELISA-тест, ПЦР, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Малина является одной из сильно поражаемых вирусами ягодных культур. К наиболее вредоносным вирусам относится вирус кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV). Вирус RBDV распространен повсеместно как за рубежом, так и на территории Беларуси [1–11]. В природных условиях RBDV передается от зараженных растений через зараженные клоны и семена, а также пылью, что способствует его быстрому распространению и делает вирус трудно контролируемым [2]. Хотя вирус и не сказывается на развитии пыльцы, но может приводить к изменениям в развитии костянок, что является причиной рассыпания плодов малины некоторых сортов. Симптомы поражения растений малины данным вирусом, наблюдаемые в условиях Беларуси, варьируют в зависимости от сорта растений. Вирус может вызывать хлороз листьев, угнетение роста растений, уменьшение размера плодов и их рассыпание, снижение урожайности. В ряде случаев инфекция может протекать бессимптомно. Симптомы, вызываемые RBDV на растениях малины, недостаточны для визуальной диагностики вируса, поскольку измельчение и рассыпание ягод может быть вызвано рядом различных причин, таких как корневая гниль, дефицит питательных веществ или недостаточное опыление. Таким образом, для идентификации вируса должны быть использованы надежные методы диагностики [3–7]. Наиболее простым и быстрым методом является использование следующих анализов: иммуноферментный и ПЦР [7, 9, 12–15]. Иммуноферментный анализ (ИФА) позволил выйти на новый этап в диагностике вирусов, поскольку обладает высокой специфичностью и чувствительностью (способен выявлять вирусные частицы в концентрации 1–100 нг/мл). Этот метод пригоден для массового тестирования растений и позволяет автоматизировать большинство этапов анализа [14]. Оптимальными сроками проведения тестирования в полевых условиях является май – начало июня. Хорошие результаты дает также тест в начале осени, когда происходит накопление сокопереносимых вирусов в корневых отпрысках малины. В летние месяцы проведение теста нежелательно ввиду возможного обратимого снижения концентрации вирусных антигенов ниже уровня чувствительности ИФА [15].

Для тестирования единичных образцов и уточнения сомнительных результатов ИФА используют ПЦР. ПЦР обладает высокой чувствительностью (в 100–1000 раз больше по сравнению

с ИФА) и возможностью выполнения анализа за один рабочий день. Благодаря ПЦР появилась возможность диагностики болезней, для которых отсутствуют антитела, а также возможность определения вирусов в тканях, которые находятся в состоянии покоя растений (в коре, древесине) вне зависимости от периода года [14].

Сотрудниками отдела биотехнологии РУП «Институт плодоводства» ранее определялась возможность тестирования на наличие вируса RBDV растений-регенерантов малины в культуре *in vitro* методом DAS-ELISA-теста [8]. Исследования методом ПЦР-анализа на наличие данного вируса у растений-регенерантов *in vitro* не проводили.

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. [12]. Для профилактики RBDV рекомендуют использовать высокоустойчивые сорта или высаживать оздоровленные безвирусные растения [1, 2].

Цель исследований – оценить эффективность культуры *in vitro* в оздоровлении малины от RBDV и эффективность праймеров CP-F/CP-R и RBDV-R/RBDV-F для диагностики RBDV в растениях-регенерантах из культуры *in vitro*.

ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2022–2023 гг.

Объекты исследований – вирус кустистой карликовости малины (RBDV); растения малины летней (Метеор, Laszka) и ремонтантной (Похвалинка, Малиновая гряда, Карамелька, Брянское диво), зараженные RBDV.

Эксплантами для введения в культуру *in vitro* служили точки роста 1–2 мм, выделенные из пазушных почек однолетних побегов малины, зараженных RBDV, в осенний период. Полученные растения-регенеранты *in vitro* культивировались на питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) [16] при следующих условиях: освещение – 2,5–3,0 тыс. лк, температура – +21...+23 °С, фотопериод – 16/8 ч.

Тестирование на наличие/отсутствие RBDV в полевых растениях малины и их *in vitro* аналогах (растениях-регенерантах) проводили методом ИФА (DAS-ELISA-тест) наборами фирмы Bioreba в соответствии с методическими рекомендациями производителя и согласно методике диагностики основных вирусных инфекций плодовых и ягодных культур [13]. Регистрация результатов велась на автоматическом ридере iMark™ (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. О зараженности исследуемых образцов судили по значениям оптической плотности окрашенного продукта ферментативной реакции анализируемых образцов (A_o) в сравнении с аналогичными показателями для отрицательного контроля (A_k). Положительными считали образцы, значение оптической плотности у которых больше чем в 2 раза превышало среднюю оптическую плотность отрицательного контроля ($A_o / A_k > 2$). Повторность анализа каждого образца двукратная.

Наличие/отсутствие RBDV в растениях-регенерантах *in vitro* также подтверждали ПЦР-анализом. РНК выделяли коммерческим набором реактивов GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва). Измерение концентрации РНК в полученном растворе проводили с помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Implen, Германия).

Аmplификацию осуществляли с использованием набора реагентов OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN®). ПЦР-реакция проводилась на амплификаторе C1000Touch (Bio-Rad, США) при следующих заданных параметрах: 50 °С – 30 мин, 95 °С – 15 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин (35 циклов); 72 °С – 10 мин – для праймеров CP-F/CP-R; 95 °С – 3 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 45 с (40 циклов); 72 °С – 7 мин – для праймеров RBDV-R/RBDV-F. Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 1 × TAE-буфере (Bio-Rad). Результаты электрофореза документировали при помощи аппаратного обеспечения Gel Doc™ EQ System (Bio-Rad).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследований методом ИФА выделены и введены в культуру *in vitro* исходные растения малины, зараженные вирусом RBDV. Предварительная оценка растений малины на весь перечень вирусов, поражающих культуру, позволила выделить растения с моноинфекцией и доказанным отсутствием других вирусных патогенов, что повышает достоверность проводимых исследований [16].

После этапа введения и стабилизации культуры *in vitro* (2 пассажа) для тестирования методом ИФА были взяты растения-регенеранты 72 клонов малины летней сорта Метеор. Оптическая плотность всех протестированных 72 образцов превышала оптическую плотность отрицательного контроля в 10–28 раз (см. таблицу).

Значения оптической плотности образцов растений-регенерантов *in vitro* малины сорта Метеор, полученные в результате тестирования методом ИФА (DAS-ELISA-тест)

№ п/п	№ меристемы (клона)	Оптическая плотность образца (A_o)	Значение отрицательного контроля (A_k)	Превышение оптической плотности образца к отрицательному контролю (A_o / A_k)
1	1	3,477	0,125	27,8
2	4	3,474	0,125	27,8
3	6	3,397	0,125	27,2
4	7	3,346	0,125	26,8
5	8	3,477	0,125	27,8
6	15	3,403	0,125	27,2
7	17	3,401	0,125	27,2
8	18	3,451	0,125	27,6
9	19	3,411	0,125	27,3
10	22	3,431	0,125	27,4
11	24	3,222	0,125	25,8
12	25	3,390	0,125	27,1
13	26	3,334	0,125	26,7
14	27	3,459	0,125	27,7
15	28	3,436	0,125	27,5
16	29	3,343	0,125	26,7
17	32	2,045	0,125	16,4
18	33	3,416	0,125	27,3
19	34	3,401	0,125	27,2
20	35	3,354	0,125	26,8
21	36	3,446	0,125	27,6
22	37	3,448	0,125	27,6
23	38	3,413	0,125	27,3
24	43	3,415	0,125	27,3
25	47	3,424	0,125	27,4
26	48	3,035	0,125	24,3
27	51	3,431	0,125	27,4
28	53	3,159	0,125	25,3
29	55	2,995	0,125	24,0
30	56	2,789	0,125	22,3
31	58	3,297	0,125	26,4
32	59	3,471	0,125	27,8
33	60	3,253	0,125	26,0
34	62	3,384	0,125	27,1

Окончание таблицы

№ п/п	№ меристемы (клона)	Оптическая плотность образца (A_o)	Значение отрицательного контроля (A_k)	Превышение оптической плотности образца к отрицательному контролю (A_o / A_k)
35	64	2,274	0,125	18,2
36	66	2,995	0,125	24,0
37	68	3,475	0,125	27,8
38	69	3,500	0,125	28,0
39	71	2,856	0,125	22,8
40	75	3,357	0,125	26,9
41	76	1,266	0,125	10,1
42	77	2,574	0,125	20,6
43	78	3,377	0,125	27,0
44	79	3,500	0,125	28,0
45	81	1,432	0,125	11,5
46	82	3,331	0,125	26,6
47	83	3,439	0,125	27,5
48	86	3,322	0,125	26,6
49	88	3,500	0,125	28,0
50	89	3,017	0,125	24,1
51	91	2,732	0,125	21,9
52	92	3,367	0,125	26,9
53	93	1,420	0,125	11,4
54	94	3,010	0,125	24,1
55	97	3,369	0,125	27,0
56	98	3,411	0,125	27,3
57	103	3,493	0,125	27,9
58	104	3,500	0,125	28,0
59	106	3,466	0,125	27,7
60	108	3,322	0,125	26,6
61	109	3,138	0,125	25,1
62	110	2,460	0,125	19,7
63	111	1,551	0,125	12,4
64	112	3,415	0,125	27,3
65	113	3,281	0,125	26,2
66	114	3,342	0,125	26,7
67	115	3,296	0,125	26,4
68	116	3,259	0,125	26,1
69	117	3,082	0,125	24,7
70	120	3,380	0,125	27,0
71	122	2,890	0,125	23,1
72	124	3,272	0,125	26,2

Следует отметить, что при проведении DAS-ELISA-теста использование протокольной и уменьшенной в 2 раза навески растительного материала в экстрагирующем буфере (что актуально для тестирования растений в культуре *in vitro*) позволило получить превышение оптической плотности образца к отрицательному контролю (A_o / A_k) до 28, это свидетельствует о высокой чувствительности метода и диагностических наборов, а также позволяет утверждать о зараженности RBDV всех введенных клонов.

ПЦР-диагностика растений-регенерантов малины проведена после длительного культивирования *in vitro* (7 пассажей). Для диагностики RBDV были использованы 2 пары праймеров: CP-F/CP-R (CP-F: 5'-TCATTGTTGAATTAATACTAAGTATTTAAG-3') (CP-R: 5'-CCCACTAGCAGGCAAATAGTC-3') [13],

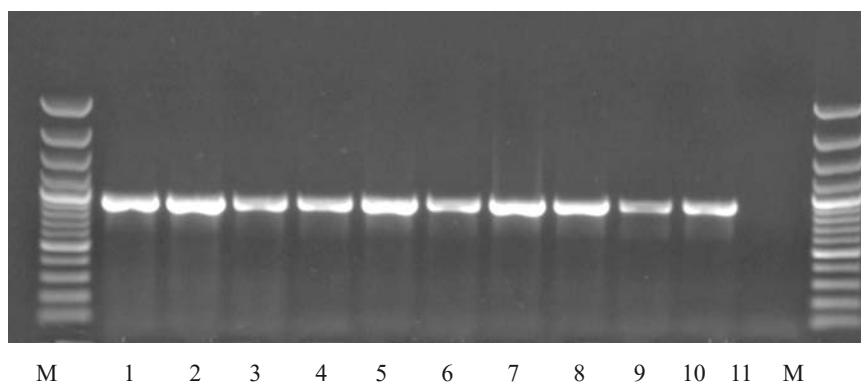


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации при ПЦР-диагностике растений-регенерантов сортов малины в культуре *in vitro* на наличие вируса RBDV с использованием праймера CP-F/CP-R: М – маркер молекулярного веса 100 bp (Thermo Scientific), треки: 1 – Похвалинка; 2 – Малиновая гряда; 3 – Laszka; 4 – Карамелька; 5–8 – Брянское диво; 9, 10 – Метеор; 11 – отрицательный контроль (K–)

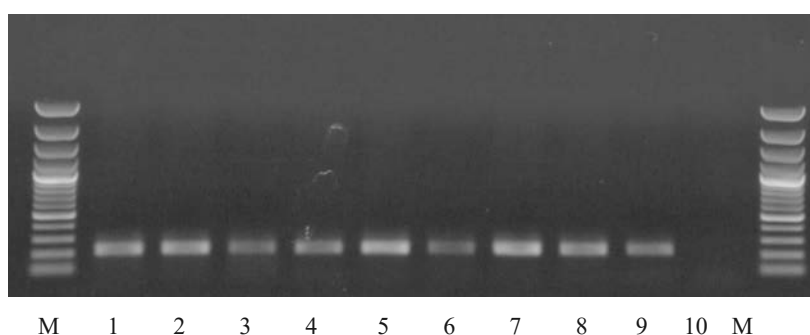


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации при ПЦР-диагностике растений-регенерантов сортов малины в культуре *in vitro* на наличие вируса RBDV с использованием праймера RBDV-F/RBDV-R: М – маркер молекулярного веса 100 bp (Thermo Scientific), треки: 1 – Похвалинка; 2 – Малиновая гряда; 3 – Laszka; 4 – Карамелька; 5–9 – Брянское диво; 10 – отрицательный контроль (K–)

размер амплифицируемого продукта – 886 п. н.; RBDV-F/RBDV-R (RBDV-F: 5'-GGGTTTGTACTCCTGAGA-3') (RBDV-R: 5'-CTTCCGAGAAGGTAATCAAC-3') [17], размер амплифицируемого продукта – 220 п. н.

В результате амплификации у всех исследуемых образцов, были получены ПЦР-продукты ожидаемого размера: 886 п. н. – для праймеров CP-F/CP-R (рис. 1) и 220 п. н. – для праймеров RBDV-F/RBDV-R (рис. 2).

Таким образом, для диагностики растений-регенерантов сортов малины в культуре *in vitro* на наличие RBDV методом ПЦР-анализа можно использовать праймеры CP-F/CP-R и RBDV-F/RBDV-R, которые позволяют получать продукт ожидаемого размера (886 и 220 п. н. соответственно).

Культура *in vitro* без применения дополнительного комплекса мер (термо- или хемотерапии) не позволяет получать растения малины, свободные от вируса кустистой карликовости малины.

ВЫВОДЫ

Экспланты для введения в культуру *in vitro* малины необходимо брать с кустов, предварительно протестированных методом ИФА или ПЦР на отсутствие RBDV, так как культура *in vitro* не освобождает растения от данного патогена. В противном случае необходимо регистрировать введенные меристемы и растения-регенеранты, полученные с каждой меристемы, что обеспечит в будущем снижение объемов тестов ИФА и ПЦР-анализа до количества введенных меристем как в культуре *in vitro*, так и *ex vitro*.

Наличие/отсутствие RBDV у растений-регенерантов в культуре *in vitro* можно определять как с помощью ИФА, так и ПЦР. DAS-ELISA-тест, с наборами фирмы Bioreba и использованием протокольной и уменьшенной в 2 раза навески растительного материала, позволил получить

превышение оптической плотности образцов к отрицательному контролю (A_0 / A_k) от 10 до 28. ПЦР-анализ с использованием праймеров CP-F/CP-R и RBDV-F/RBDV-R позволяет получить продукт ожидаемого размера 886 и 220 п. н. соответственно, не показывая ложноотрицательного результата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Тихонова, К. О. Распространенность, вредоносность вирусных болезней и эффективные методы оздоровления малины : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.07 / К. О. Тихонова ; Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – М., 2016. – 24 с.
2. Оздоровление малины от вируса кустистой карликовости (RBDV) методом комплексной терапии в культуре *in vitro* / О. Ю. Антонова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29, № 7. – С. 61–64.
3. Распространенность, вредоносность вирусных болезней малины и современные методы оздоровления / М. Т. Упадышев [и др.] // Современные тенденции устойчивого развития ягодоводства России (земляника, малина) : сб. науч. тр., посвящ. 90-летию со дня рождения канд. с.-х. наук К. Т. Ярковой / М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Федер. науч. центр им. И. В. Мичурина ; редкол.: М. Ю. Акимов (гл. ред.) [и др.]. – Мичуринск-наукоград РФ, 2019. – С. 292–307.
4. Valasevich, N. Molecular characterization of *Raspberry bushy dwarf virus* isolates from Sweden and Belarus / N. Valasevich, N. Kukharchyk, A. Kvarnheden // Arch. of Virology. – 2011. – Vol. 156. – P. 369–374.
5. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips / Q. Wang [et al.] // Molecular Plant Pathology. – 2008. – Vol. 9, № 2. – P. 237–250.
6. Молекулярная характеристика патогенных вирусов плодовых и ягодных культур / Н. Н. Волосевич [и др.] // Генетические основы селекции растений : в 4 т. Т. 4 : Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / Ин-т генетики и цитологии ; науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск, 2014. – Гл. 16. – С. 441–450.
7. 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.
8. Колбанова, Е. В. 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 // Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства» ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 30. – С. 131–135.
9. Кухарчик, Н. В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н. В. Кухарчик. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 209 с.
10. Ухатова, Ю. В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровление от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур : дис. ... канд. биол. наук : 06.01.05 / Ю. В. Ухатова. – СПб., 2017. – 137 л.
11. Вирусные болезни на сортах малины *Rubus idaeus* L. и современные методы оздоровления / М. Т. Упадышев [и др.] // Аграр. наука. – 2019. – № 3. – С. 143–146.
12. Certification scheme for *Rubus*. EPPO Standards PM 4/10 (2) // Bulletin OEPP/EPPO. – 2009. – Vol. 39. – P. 271–277.
13. Методика диагностики основных вирусных инфекций плодовых и ягодных культур / Н. В. Кухарчик [и др.]. – Минск : А. Н. Вараксин, 2015. – 32 с.
14. Рягузова, Т. В. Диагностика вирусов плодово-ягодных культур и современные методы их оздоровления / Т. В. Рягузова // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2020. – Т. 7, № 1–2. – С. 130–134.
15. Технология получения оздоровленного от вирусов посадочного материала плодовых и ягодных культур : метод. указания / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Рос. науч.-исслед. ин-т информации и техн.-экон. исслед. по инж.-техн. обеспечению агропром. комплекса ; сост.: М. Т. Упадышев [и др.]. – М. : Росинформагротех, 2013. – 92 с.
16. Гашенко, О. А. Оценка распространенности патогенных вирусов малины и оздоровления от RBDV на этапе инициации культуры *in vitro* / О. А. Гашенко, Н. В. Кухарчик // Global sci. a. innovations 2022: Centr. Asia. – 2022. – № 4 (18), т. II. – С. 52–56.
17. Чердакли, А. А. Выделение РНК из растительных тканей малины и смородины черной для идентификации вирусов RBDV и BRV [Электронный ресурс] / А. А. Чердакли, С. Радзениец // Федер. науч. селекц.-технол. центр садоводства и питомниководства. – 2020. – Режим доступа: <https://vstisp.org/vstisp/index.php/internet-konferentsiya/41-small-fruits/1350-doklady-konferentsii-reshenie-problem-v-pitomnikovodstve-i-sadovodstve>. – Дата доступа: 14.11.2022.

EFFECTIVENESS OF ELISA AND PCR-TESTS IN DIAGNOSIS RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS (RBDV) IN RASPBERRY PLANTS IN *IN VITRO* CULTURE

O. A. GASHENKO, T. N. BOZHIDAI, E. V. KOLBANOVA, N. V. KUKHARCHIK

Summary

The studies were carried out in the Biotechnology Department of the RUE “Institute of Fruit Growing” in 2022–2023 on summer-bearing raspberry varieties (Meteor, Laszka) and remontant raspberry (Pokhvalinka, Malinovaya griada, Karamelka, Bryanskoje divo) infected with *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV). Explants for introduction into *in vitro*

culture of raspberry must be taken from the bushes previously tested by ELISA or PCR for the absence of RBDV, since *in vitro* culture does not make plants free from this pathogen. To reduce the volume of ELISA and PCR tests, it is necessary to register the introduced meristems and regenerated plants obtained from each meristem both in culture *in vitro* and *ex vitro*. The presence or absence of RBDV in regenerative plants in *in vitro* culture can be determined using both ELISA and PCR.

The studies were carried out as part of the agreement with the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research No.B22MLDG-007 dated April 1, 2022, task “Development of biotechnological methods (*in vitro* and *ex vitro*) for recovery from the *Raspberry bushy dwarf virus* in order to increase the productivity of commercial raspberry plantations” (2022–2023).

Keywords: raspberry, *in vitro* culture, raspberry bushy dwarf virus (RBDV), DAS-ELISA test, PCR, Belarus.

Поступила в редакцию 31.03.2023