

УДК 633.791:632.38:58.083.3

О. А. ГАШЕНКО, Н. Н. ВОЛОСЕВИЧ, Е. В. КОЛБАНОВА,
М. С. КАСТРИЦКАЯ, Н. В. КУХАРЧИК

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ *APPLE MOSAIC VIRUS*
МЕТОДОМ DAS-ELISA-ТЕСТА
ПРИ ХРАНЕНИИ ОБРАЗЦОВ ХМЕЛЯ (*HUMULUS LUPULUS*)**

Институт плодоводства, аг. Самохваловичи, e-mail: belhort@it.org.by

(Поступила в редакцию 29.01.2015)

Введение. Вирус мозаики яблони (*Apple mosaic virus*, АрMV) относится к роду *Ilarvirus*, семейству Bromoviridae и является одним из основных вирусных патогенов хмеля. Вирус распространен по всему миру и имеет широкий спектр растений-хозяев. Экспериментально или в естественных условиях им может быть инфицировано 65 видов растений из 19 родов.

Распространение АрMV в насаждениях хмеля происходит достаточно медленно, но очень сильно зависит от сортовых особенностей. Симптомы АрMV на растениях хмеля проявляются в виде хлоротической пятнистости, переходящей в некротическую пятнистость. Некротические пятнистости могут развиваться лишь на некоторых поврежденных листьях, вызывая их преждевременное опадение. Локализация вируса в растениях неравномерна: наряду с пораженными листьями на растении встречаются и визуально здоровые листья. В связи с поражением вирусом мозаики яблони рост растений может замедляться. Выраженные признаки вирусной инфекции легко обнаружить после резких перепадов температуры. Поражение этим вирусом насаждений может привести к потере до 50,0 % урожая шишек хмеля [1–8]. Хотя перенос большинства иларвирусов обычно осуществляется насекомыми (трипсами), семенами и пылью, для вируса АрMV такие способы переноса подтверждены не были. Однако, так же как и другие представители иларвирусов, АрMV может переноситься при вегетативном размножении и прививке [9–11].

В системе мониторинга фитосанитарного состояния насаждений важное место занимает метод иммуноферментного анализа (ELISA-тест). ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) – это иммунологический анализ с использованием конъюгированных с ферментом антител и антител, иммобилизованных на твердой подложке. Метод позволяет измерять изменение активности фермента щелочной фосфатазы, которое пропорционально концентрации антител, вовлеченных в иммунологическую реакцию. ELISA является исключительно высокочувствительным и специфичным методом, который предоставляет широкие возможности для автоматизации работ и получения количественных оценок. Кроме того, данный метод обладает высокой чувствительностью и быстротой проведения и в настоящее время является наиболее пригодным для массовой диагностики вирусов [2].

Большинство фирм-производителей, выпускающих коммерческие наборы для тестирования вирусов растений методом ELISA, рекомендуют использовать для анализа свежесобранные образцы с минимальным сроком хранения. Однако в некоторых случаях (например, при больших объемах тестирования) возникает необходимость в хранении образцов для проведения срав-

нительных тестов или для анализа образцов, собранных в течение сезона с разных насаждений. Наиболее простым и не требующим наличия дорогостоящего оборудования методом хранения образцов является замораживание и хранение листьев зараженных растений при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Следует отметить, что вид растения-хозяина вируса, а также видовая принадлежность вирусного патогена сильно влияют на сохранение вирусом своих антигенных свойств в процессе хранения. Так, например, при хранении замороженных ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) листьев картофеля, инфицированных вирусами А, S, X или Y, значения оптических плотностей в ELISA тесте снижались для трех (вирусы А, S, X) из четырех тестируемых вирусов [12]. В то же время сравнение значений оптических плотностей при тестировании свежих и замороженных листьев злаковых, зараженных тремя изолятами *Barley yellow dwarf virus*, показало их одинаковый уровень антигенной активности [13, 14]. Очевидно, что для каждой пары растение–вирус подбор условий хранения образцов для тестирования должен быть индивидуальным. Из-за отсутствия информации о способности вируса мозаики яблони взаимодействовать с антителами после хранения в замороженном виде представляло интерес оценить эффективность диагностики ArMV при использовании замороженных листьев хмеля в качестве материала для тестирования, а также влияние длительности экспозиции растительного экстракта до контакта с покровными антителами на эффективность тестирования.

Материалы и методы исследования. Иммуноферментный анализ проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства».

Объекты исследований: свежие и замороженные листья сортов хмеля Hallertaner Magnum, Northern Brewer, Perle, зараженные вирусом мозаики яблони (ArMV); 6 изолятов вируса ArMV (по два изолята вируса трех сортов растений хмеля); изоляты вируса № 28 и № 35 (получены из растений сорта Hallertaner Magnum), изоляты № 38 и № 39 (из сорта хмеля Northern Brewer), изоляты № 48 и № 58 (из сорта хмеля Perle).

Листья зараженных растений хмеля были собраны в ООО «БелХмельАгро» Брестской области в июне 2014 г. Часть листьев сразу же гомогенизировали (по 0,3 г) в экстрагирующем буфере (1:10) для проведения анализа, остальные хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 дней для повторного тестирования методом ИФА.

Для проведения иммуноферментного анализа (DAS-ELISA-test) использовали диагностические наборы фирмы SEDIAG (Франция). Анализ проводили в соответствии с методическими указаниями фирмы-производителя, регистрацию результатов – на автоматическом ридере PR 2100 (Bio-Rad) при длине волны 405 нм (A_{405}). О зараженности исследуемых образцов судили по отношению значений оптической плотности окрашенного продукта ферментативной реакции анализируемых образцов (A_o) к показателю отрицательного контроля (A_k).

Положительными (зараженными вирусом) считали образцы, среднее значение оптической плотности которых в 2 раза и более превышало среднее значение оптической плотности отрицательного контроля ($A_o/A_k \geq 2$). Для каждой микроплаты среднее значение оптической плотности отрицательного и положительного контролей устанавливалось отдельно. Десятикратное превышение положительного контроля над отрицательным давало основание судить о достоверности результатов тестирования. Повторность анализа для каждого образца была двукратной.

Результаты и их обсуждение. Результаты тестирования изолятов ArMV в свежесобранных и замороженных листьях показали, что значения оптических плотностей значительно варьировались в зависимости от изолята вируса (рис. 1). Самые высокие значения оптической плотности в исходных (свежих) образцах были отмечены у изолятов вируса № 28 из сорта Hallertaner Magnum и № 48 из сорта Perle (A_o/A_k составило 17,1 и 16,2 соответственно). Самые низкие значения оптической плотности в свежих листьях были получены у изолята вируса № 38 из сорта Northern Brewer ($A_o/A_k = 6,7$).

После хранения образцов при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ у 4 (№ 28, 38, 39, 58) из 6 тестируемых изолятов значения оптической плотности значимо не отличались от данных, полученных при тестировании свежих листьев. Сохранение антигенной активности вируса ArMV в процессе хранения не зависело от сорта растения-хозяина, поскольку изоляты вируса из двух сортов (Perle и Hallertaner Magnum) могли как сохранять способность реагировать с антителами на одном уровне со свежими образцами (изоляты № 28 сорта Hallertaner Magnum и № 58 сорта Perle), так и зна-

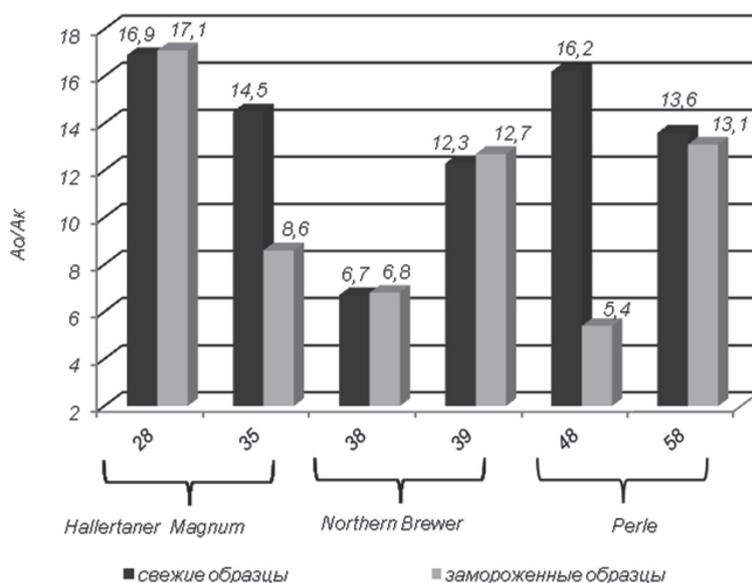


Рис. 1. Соотношение среднего значения оптической плотности образцов и среднего значения оптической плотности отрицательного контроля при использовании для анализа незамороженных и замороженных листьев, зараженных ApMV (по результатам ИФА, 2014)

чительно ее терять (изоляты № 35 сорта Hallertaner Magnum и № 48 сорта Perle). Из 6 исследуемых изолятов хуже всех замораживание переносил изолят № 48 сорта Perle, способность которого к связыванию с антителами после хранения при -20°C падала в 3 раза (A_0/A_k при тестировании свежих и замороженных листьев составило соответственно 16,2 и 5,4). Еще одним изолятом, плохо переносившим замораживание, был изолят № 35 сорта Hallertaner Magnum, значение A_0/A_k у которого уменьшилось в 1,7 раза (от $A_0/A_k = 14,5$ для свежесобранных образцов до $A_0/A_k = 8,6$ для замороженных).

Следует отметить, что оба изолята вируса ApMV сорта Northern Brewer (№ 38, № 39) сохраняли антигенную активность в ходе хранения при -20°C , а показатели их оптической плотности значимо не отличались от значений, полученных при тестировании свежих образцов ($A_0/A_k = 6,8$ и $A_0/A_k = 6,7$ для изолята № 38, $A_0/A_k = 12,7$ и $A_0/A_k = 12,3$ для изолята № 39).

Для оценки чувствительности ELISA-теста готовили серию разведений клеточного сока, используя замороженные листья двух сортов хмеля (Hallertaner Magnum и Perle). В эксперименте участвовали два изолята ApMV вируса: изолят № 28, сохранявший свою антигенную активность при замораживании, и изолят № 48, который после замораживания в 3 раза хуже взаимодействовал с покровными антителами. Результаты эксперимента показали, что значения A_0/A_k для обоих изолятов снижались при каждом последующем разведении (рис. 2).

Следует отметить, что в случае, если для тестирования использовали растительную ткань с высоким содержанием вируса, сохранялась возможность его определения даже в очень разведенных образцах. Так, изолят ApMV № 28 из сорта Hallertaner Magnum, значение A_0/A_k которого до разведения было 17,1, успешно определялся даже при разведении клеточного сока в 1000 раз. В то же время изолят вируса № 48 сорта хмеля Perle, значение A_0/A_k которого составляло 5,4 до разведения и было в 3 раза ниже, чем у изолята № 28, определялся гораздо хуже. Пределом чувствительности ELISA-теста для данного изолята было разведение клеточного сока до 1:400.

Следующим этапом нашей работы была оценка влияния длительности экспозиции растительного экстракта из замороженных листьев до контакта с покровными антителами на эффективность тестирования. Необходимость уточнения данного вопроса связана с тем, что фирмы-производители наборов для ELISA-теста допускают возможность хранения гомогенизированного в экстрагирующем буфере растительного материала при $+4^{\circ}\text{C}$ до 12 ч при использовании свежесобранных образцов, что может быть актуально при массовом тестировании большого количества образцов. Однако в литературе нет данных о возможности длительной экспозиции рас-

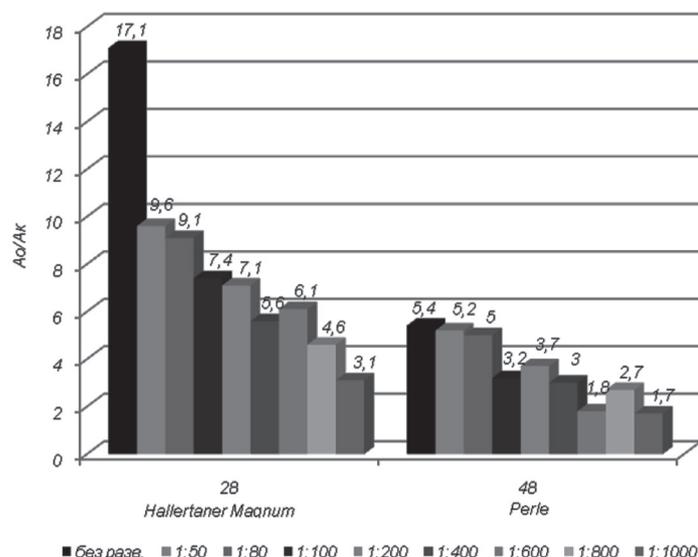


Рис. 2. Соотношение среднего значения оптической плотности образцов (изоляты из двух сортов хмеля) и среднего значения оптической плотности отрицательного контроля при использовании для анализа разведений клеточного сока, содержащего АрMV

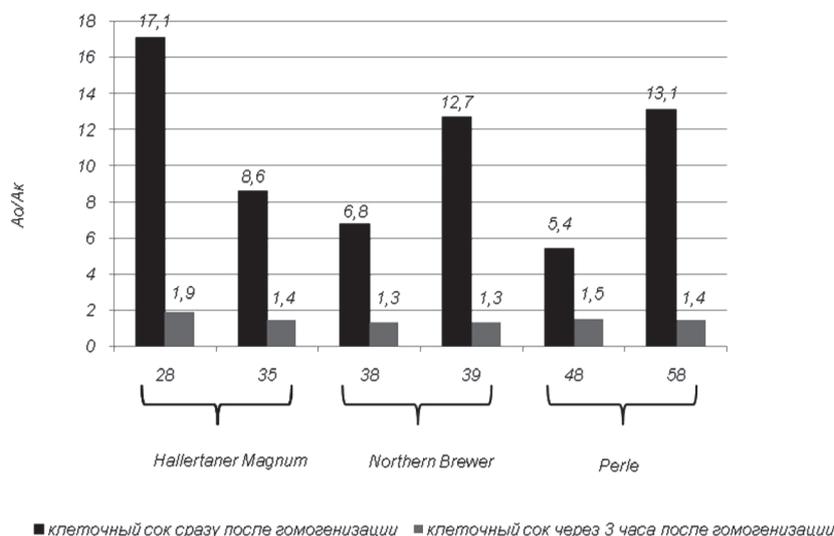


Рис. 3. Соотношение среднего значения оптической плотности образцов и среднего значения оптической плотности отрицательного контроля при использовании для анализа клеточного сока, содержащего АрMV, сразу после гомогенизации замороженной растительной ткани и через 3 ч после нее

тительного экстракта из замороженных листьев до контакта с покровными антителами. Для уточнения данного вопроса проводили тестирование растительных экстрактов из замороженных листьев (3 сорта хмеля, 6 изолятов вируса) непосредственно после гомогенизации образцов, а также после 3 ч хранения растительных экстрактов при +4 °С. В результате тестирования было установлено, что хранение растительных экстрактов из замороженных листьев отрицательно сказывается на способности вируса взаимодействовать с покровными антителами. Для всех исследуемых изолятов вируса значения A_0/A_K после 3 ч хранения при +4 °С увеличивались не более чем в 2 раза, что не позволяло диагностировать вирус в растительной ткани (рис. 3). Соответственно, при использовании замороженных образцов для тестирования ключевым моментом является использование клеточного сока сразу после гомогенизации образца.

Заключение. Впервые в Беларуси определена эффективность диагностики вируса мозаики яблони при использовании замороженных листьев хмеля в качестве материала для тестирования.

Установлено, что после хранения листьев при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ у 4 (№ 28, 38, 39, 58) из 6 тестируемых изолятов значения оптической плотности значимо не отличались от данных, полученных при тестировании свежих листьев. Из 6 исследуемых изолятов вируса 2 (№ 35 и № 48) значительно хуже взаимодействовали с покровными антителами после замораживания (значения A_0/A_K для изолята № 48 снижались в 3 раза после замораживания, для изолята № 35 – в 1,7 раза). Сохранение антигенной активности вируса ApMV в процессе хранения не зависело от сорта растения-хозяина.

Оценка чувствительности ELISA-теста с участием серии разведений клеточного сока показала, что в случае, если для тестирования использовали растительную ткань с высоким содержанием вируса, сохранялась возможность определить наличие ApMV даже в очень разведенных (до 1:1000) образцах.

Установлено, что хранение растительных экстрактов из замороженных листьев после гомогенизации отрицательно сказывается на способности вируса взаимодействовать с покровными антителами. Для 6 исследуемых изолятов вируса значения A_0/A_K после 3 ч хранения при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ увеличивались не более чем в 2 раза, что не позволяло диагностировать вирус в растительной ткани.

Литература

1. Pethybridge S. J., Hay F. S., Barbara D. J., Eastwell K. C. et al. // Plant Dis. 2008. Vol. 92, N 3. P. 324–338.
2. Кухарчук Н. В. // Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси. Минск, 2012.
3. Aramburu J., Rovira M. // J. of Horticult. Sci. and Biotechnol. 1998. Vol. 73. P. 97–101.
4. Gottlieb A. R., Berbee J. G. // Phytopathology. 1973. Vol. 63. P. 1470–1477.
5. Tzanetakis I. E., Martin R. R. // Plant Dis. 2005. Vol. 89. P. 31.
6. Wong S. M., Horst R. K. // J. of Phytopathol. 1993. Vol. 139. P. 33–47.
7. Certification schemes. Pathogen-tested material of Hop. EPPPO Standards PM 4/16 (1) // Bull. OEPP/EPPO. 1998. Vol. 23. P. 735–736.
8. Postman J. D., Denoma J. S., Reed B. M. // Acta Horticulturae. 2005. Vol. 668. P. 143–147.
9. Choi S. H., Ryu K. H. // Plant Pathol. J. 2003. Vol. 19. P. 159–161.
10. Postman J. D., Cameron H. R. // Plant Dis. 1987. Vol. 71. P. 944–945.
11. Greber R. S., Klose M. J., Milne R. S., Teakle D. S. // Ann. Appl. Biol. 1991. Vol. 118. P. 589–593.
12. Singh R. P., Somerville T. H. // Plant Dis. 1983. Vol. 67. P. 1133–1136.
13. Lister R. M., Rochow W. F. // Phytopathology. 1979. Vol. 69. P. 649–654.
14. Rochow W. F. // Phytopathology. 1979. Vol. 69. P. 655–660.

O. A. HASHENKA, N. N. VOLOSEVICH, E. V. KOLBANOVA, M. S. KASTRITSKAYA, N. V. KUCHARCHIK

IDENTIFICATION OF ANTIGENIC ACTIVITY APPLE MOSAIC VIRUS METHOD OF DAS-ELISA-TEST AFTER STORAGE OF HOP SAMPLES (*HUMULUS LUPULUS*)

Summary

The results of ApMV diagnostics efficiency with using frozen leaves as the tested material were presented in the article. It was determined that after leaves storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ optical density did not differ significantly from using of fresh material. Conservation of antigenic activity didn't depend on host plant cultivar. The estimation of ELISA-test susceptibility using the range of cell sap dilution showed that using the plant sample with high concentration of virus made possible to detect ApMV in highly diluted solution (up to 1:1000). Storage of plant extracts from frozen leaves after homogenization influenced negatively on viral capacity to react with cover antibodies.