

ВИКОРИСТАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ (ІФА) В ДІАГНОСТИЦІ
ВІРУСІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CORYLUS* L.

Розглянуто теоретичні основи і практичне використання методу імуноферментного аналізу в діагностиці вірусів представників роду *Corylus* L. та наведено результати досліджень розподілу вірусної інфекції серед видів і форм цього роду різного походження.

Вступ

У природній флорі України росте лише один вид роду *Corylus* L. — ліщина звичайна (*Corylus avellana* L.), що здавна використовується як горіхоплідна кущова рослина, а в останні два століття і як декоративна. У ботанічних установах, дендропарках, лісових господарствах, зеленбудах та приватних садибах нашої держави можна натрапити на низку інтродукованих видів, сортів і форм цього роду [6].

Нині колекційний фонд роду *Corylus* Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України є найбільшим в Україні, і нараховує 14 видів і 15 форм ліщини та 111 сортів і гібридів фундуку [7].

Насадження горіхоплідних впродовж усього періоду свого життя зазнають впливу найрізноманітніших хвороб, склад яких визначається насамперед складом та віком насаджень. Згідно літературних даних *C. avellana* та *C. maxima* Mill. належать до найбільш сприйнятливих до вірусних інфекцій видів [16].

Багато дослідників [12, 16] вважають однією з основних причин ослаблення насаджень ліщини — ураження рослин різноманітними хворобами, зокрема вірусними, що зменшує продуктивність ліщини й сортів фундуку. Віруси цієї культури часто викликають захворювання, що зумовлюють навіть повну загибель рослин. Як відомо, в процесі репродукції цих патогенів можуть індукуватись складні патологічні зміни клітини та самого організму.

Протягом останніх років вірусні хвороби плодкових культур стали об'єктом інтенсивного вивчення майже в усіх країнах світу, що зумовлене їх широким розповсюдженням та високою шкідливістю. Дані хвороби завдають значних збитків плодівництву. Інфіковані

насадження плодкових культур зменшують кількість та якість врожаю, знижується їх стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища [3].

З самого початку вивчення вірусних хвороб рослин виникла актуальна проблема їх розпізнання та швидкої діагностики. Візуальне спостереження за проявом зовнішніх симптомів не є надійним методом, так як їх поява залежить від взаємодії вірусу і рослини. До того ж штами одного вірусу можуть викликати різні симптоми на одній і тій самій рослині, реакція якої варіює від сильної чутливості до безсимптомного носійства вірусу. У 1974 р. було запропоновано новий серологічний метод — імуноферментний аналіз (ІФА) або ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Цей метод неодноразово модифікувався і нині широко використовується для діагностики вірусів плодкових культур, які передаються соком [9, 10, 11, 13, 15].

Методи досліджень, оснований на виявленні антигенної специфічності вірусів, не залежать від взаємовідносин вірусу і рослини. Завдяки специфічності, антитіла (АТ) реагують лише з тими антигенними детермінантами, у відповідь на введення яких вони утворились, або з вірусами, подібними за антигенною структурою. Інша перевага імунологічних методів — швидкість отримання результатів та надійність [4].

Однак, не дивлячись на розробку ELISA-тестів, вони досить часто дають помилкові результати і мають свої недоліки у детекції вірусів плодкових культур. По-перше, достовірність результатів залежить від концентрації вірусів у клітинах. Чим нижча концентрація вірусу, тим більше може бути число

псевдонегативних результатів. Впродовж літа у багатьох рослин плодів концентрація вірусів падає і це не дає змогу детектувати їх методом ІФА. Для деяких рослин плодів метод вважається надійним лише протягом приблизно трьох місяців в період розпускання бруньок. По-друге, на результати впливає дія інгібуючих ефектів полісахаридів та фенольних сполук, які містяться в соці деревних рослин [14].

Матеріали та методи досліджень

Рослини можуть бути носіями вірусів, а значить, становити небезпеку для використання їх за маточні дерева, навіть при відсутності жодних проявів вірусної інфекції [2]. Тому, в наших дослідженнях зразки відбиралися як за візуальними симптомами (зразки, з симптомами подібними до ураження ВМЯ), так і без жодних проявів вірусних ознак — рендомізовано [8]. Відбір зразків проводили в насадженнях ліщини на території НДП «Софіївка» НАНУ. Обстеження насаджень проводили по двох діагоналях і чотирьох сторонах досліджуваної ділянки. Оглядали насадження двічі на рік: навесні — при повному розвитку перших трьох-чотирьох листків, та наприкінці літа — друга хвиля росту плодів дерев та дозрівання плодів в цілях апробації їх сортових ознак та виявлення можливих симптомів вірусних хвороб [1]. При обстеженні дерев оглядали крону кожного дерева, насамперед з північного боку, де симптоми яскравіше проявляються і довше зберігаються під час літньої спеки. Проби відбирали рівномірно з чотирьох боків дерева з гілок, розміщених у внутрішній частині крони ближче до штамба на висоті не більше 2-х метрів. Відбирали верхню частину пагона з молодими листками. У разі відбору зразків у період спокою відбирали здерев'янілі дворічні пагони завдовжки 20–30 см, що ростуть на штабмі. Відібрані зразки упаковували в поліетиленові пакети з етикетками із зазначенням сорту дерева, місця і дати відбору. Надалі зразки відразу детектували на наявність вірусної інфекції методом ІФА або залишали на 1–2 доби в холодильнику при температурі +40С для зберігання.

У дослідженнях було використано метод класичного імуноферментного аналізу в модифікації сендвіч. В основу методу покладено принцип мічених ферментом антитіл. Основним ферментом для проведення аналізу рослинного матеріалу є лужна фосфатаза. Ідентифікацію вірусів проводили

з комерційними тест-системами фірми «LOEWE» (Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника.

Обладнання:

1. Мікропланшети імунологічні на 96 лунок, (Nunc, Німеччини).
2. ІФА-рідер Stat Fax 2100 (Awarennes Technology, США).
3. Ручний 8-канальний дозатор змінних об'ємів (ТермоЛабСистем, Росія).
4. Ступки з пестлями.
5. Електричний дозатор змінних об'ємів.
6. Механічні дозатори змінних та фіксованих об'ємів.
7. Інкубаційна шафа з регульованою температурою.
8. Холодильник.

Реактиви:

1. Покривний буфер (на 1 л), рН 9,6:
1,59 г Na_2CO_3 ;
2, 93 г NaHCO_3 .
2. Буфер для промивання (на 1 л), рН 7,2–7,4:
8,0 г NaCl ;
2,9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$;
0,2 г KH_2PO_4 ;
0,2 г KCl ;
0,5 мл Tween-20.
3. Кон'югатний буфер (буфер для проб) (на 1 л), рН 7,4

Буфер для промивання із додаванням:

- 20 г полівінілпіролідону (в'язкість К10–К40);
- 2г бичачого сироваткового альбуміну;
- 0,1 г NaN_3 .

4. Субстратний буфер (на 1 л), рН 9,8:

- 97 мл диетаноламіну;
- 0,2 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$.

5. Субстратний розчин:

1мг/мл 4-нітрофеніл-фосфат динатрієвої солі у субстратному буфері. (Розчин готується безпосередньо перед використанням).

Для аналізу використовували зелені листки, бруньки, попередньо подрібнені та розтерті із додаванням кон'югатного буферу до гомогенного стану у ступці з товчачиком. Розведення проби в гомогенаті — 1:100.

Гомогенат центрифугували при 5000 об/хв протягом 10 хв. На імунологічний планшет наносили очищений супернатант.

Діагностику ВМЯ та ВНКП, ВХКП проводили за стандартною методикою DAS-ELISA [5].

Методика проведення DAS-ELISA для детекції ВМЯ та ВНКП, ВХКП

1. Покрыття поверхні імунологічних планшет антиген-специфічними антитілами:

а) Імуноглобуліни, розведені в співвідношенні 1:200 в покривному буфері вносяться в кожну лунку планшету (за винятком лунки А1) у кількості 0,1 мл та інкубуються 4 години при 37°C (або ніч при t 4°C). Останні умови інкубації більш сприятливі, оскільки при такій інкубації краще зберігається об'єм реакційної суміші в крайових лунках.

б) 4-х разове промивання планшету буфером для промивання по 3–5 хв. кожне. Після кожного промивання плашку енергійно струшують і 2–3 рази вибивають різким рухом на фільтрувальний папір.

2. Зв'язування антигену з фіксованим антитілом та утворення комплексу антиген-антитіло.

а) Проба, розведена в співвідношенні 1:10 в буфері для проб, вноситься у кількості 0,1 мл в кожну лунку (за винятком лунки А1). Контрольна проба розводиться в 1мл буферу для проб, вноситься в лунку в еквівалентній кількості. Інкубація проводиться протягом ночі при 4°C.

б) 5-ти разове промивання буфером для промивання.

3. Реакція комплексу антиген-антитіло з антитілами, міченими ферментом лужною фосфатазою з утворенням комплексу антиген-антитіло-антиген.

а) У кожну лунку вноситься по 0,1 мл антитіл, мічених ферментом, розведених у співвідношенні 1:200 у буфері для проб. Надалі проводиться інкубація протягом 4-х годин при 37°C (або ніч при 4°C).

б) 5-ти разове промивання буфером для промивання.

4. Ферментативна кольорова реакція на присутність специфічного антигену, яка виявляється

в позитивній реакції лужної фосфатази з 4-нітрофеніл-фосфатом з утворенням 4-нітрофенолу.

а) В кожну лунку (в лунку А1 також) вноситься по 0,1 мл розчину субстрату, інкубація проводиться при кімнатній температурі.

б) Ферментативна реакція оцінюється спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм через 1 годину та 2 години. Реактивна суміш у лунках плашки фіксується 3М NaOH по 0,1мл на лунку, коли колір позитивного контролю буде чітко відрізнятися від кольору лунки А1 та кольору негативного контролю.

Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Start Fax 2100 (Awarennes Technology, США) при довжині хвилі 405 нм (для АТ, мічених лужною фосфатазою). За позитивний приймався показник Е 405, що втричі перевищував показник негативного контролю.

За допомогою цього методу можливо проводити своєчасне відбракування хворого та відбір здорового посадкового матеріалу, оцінку стійкості вихідних форм та продуктів селекції при виведенні вірусостійких сортів культурних рослин [5].

Результати досліджень

Серед протестованих ІФА зразків з насаджень НДП «Софіївка» НАНУ ідентифіковано антиген вірусу некротичної кільцевої плямистості листя ліщини (ВНКП) в 68,4% досліджуваних зразків, антиген вірусу мозаїки яблуні (ВМЯ) в 23,3%, антиген вірусу хлоротичної кільцевої плямистості (ВХКП) в 18,3%, змішана вірусна інфекція в 1,7% досліджуваних зразків. Вірус некротичної кільцевої плямистості листя ліщини виявлено в дев'яти зразках, вірус хлоротичної кільцевої плямистості — лише в одному зразку, а вірус мозаїки яблуні — у п'яти зразках (табл. 1).

1. Результати тестування зразків рослин представників роду *Corylus* L. в насадженнях НДП «Софіївка» НАНУ на наявність вірусних антигенів методом ІФА

№	Зразок	ВМЯ	ВНКП	ВХКП
1	<i>C. avellana</i> L.	+	+	—
2	<i>C. a.</i> 'Fuscorubra'	+	+	—
3	<i>C. a.</i> 'Laciniata'	—	+	—
4	<i>C. chinensis</i> Franch.	+	+	—
5	<i>C. colurna</i> L.	+	+	—
6	<i>C. heterophylla</i> Fish.	—	—	—

1	2	3	4	5
7	<i>C. mandshurica</i> Maxim.	—	+	—
8	<i>C. maxima</i> Mill.	+	—	+
9	<i>C. maxima</i> 'Atropurpurea'	—	—	—
10	<i>C. pontica</i> C. Koch.	—	+	—
11	<i>C. sieboldiana</i> Blume	—	+	—
12	<i>C. tibetica</i> Batal.	—	+	—

На рослинах базового виду *C. avellana* та його форми *C. a.* 'Fuscorubra' антиген вірусу ВХКП не було виявлено, натомість було ідентифіковано антигени вірусів ВМЯ і ВНКП, тоді як на рослинах *C. a.* 'Laciniata' виявлено антиген тільки ВНКП. Антигени вірусів ВМЯ і ВНКП ідентифіковано на рослинах *C. chinensis* Franch. і *C. colurna* L. На рослинах базового виду *C. maxima* Mill. ідентифіковано антигени вірусів ВМЯ і ВХКП, тоді як ВНКП не було, а форма *C. m.* 'Atropurpurea' була вільною від вірусів так само як і зразки рослин *C. heterophylla* Fish. В той же час в зразках рослин *C. mandshurica* Maxim., *C. pontica* C. Koch., *C. sieboldiana* Blume та *C. tibetica* Batal. було виявлено лише антигени вірусу ВНКП.

Отже, тестування зразків представників роду *Corylus* методом ІФА дали змогу виявити широке розповсюдження вірусних інфекцій. Закономірності розподілу вірусної інфекції серед видів і форм різного походження представників роду *Corylus* виявлені не були.

Висновки

Внаслідок проведеного скринінгу вірусних інфекцій методом ІФА представників роду *Corylus* L. в насадженнях НДП «Софіївка» НАНУ визначено їх нерівномірне розповсюдження. З'ясовано, що найбільш розповсюджений вірус ВНКП, менше — ВМЯ, ще менше — ВХКП.

Перелік посилань

1. *Болезни плодово-ягодных культур и винограда // Болезни сельскохозяйственных культур: в 3 т. / [под ред. Пересыпкина В. Ф.]. — К.: Урожай, 1989. — Т. 2: Болезни овощных и плодовых культур. — 1989. — С. 59–87.*
2. *Бондаренко П. Є. Дослідження розповсюдженості вірусних захворювань плодових на Україні / П. Є. Бондаренко, Л. Ю. Глушак // Садівництво. — 1987. — № 3. — С. 13–16.*
3. *Вердеревская Т. Д. Вирусные и микоплазменные*

заболевания плодовых культур / Вердеревская Т. Д. — Кишинёв: Штиинца, 1981. — 174 с.

4. *Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений / Р. В. Гнутова. — М.: Наука, 1993. — 300 с.*
5. *Господарик А. В. Молекулярно-біологічні властивості українських ізолятів латентних вірусів яблуні. // Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спец. вірусологія. 2009. — 144 с.*
6. *Косенко І. С. Ліщини в Україні. — К.: Академперіодика, 2002. — 266с.*
7. *Косенко І. С. Мобілізація генетичних ресурсів роду *Corylus* L. у Національному дендрологічному парку «Софіївка» НАН України. // Вісті біосферного заповідника «Асканія-Нова». — Т. 14. — 2012. — С. 156–160.*
8. *Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин: Учеб. пособие [для биологич. спец. вузов]. — [3-е изд. перераб. и доп.]. — М.: Высшая школа. — 1980. — 293 с.*
9. *Clark M. F. Characteristics of the microplate method of the enzyme — linked immunosorbent assay for the detection of plant virus / M. F. Clark, A. N. Adams // J. Gen. Virol. — 1977. — 34. — № 3. — P.475–483.*
10. *Fleg C. L. The detection of Apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / C. L. Fleg, M. F. Clark // Ann. Appl. Biol. — 1979. — 91. — P. 61–65.*
11. *Fuchs E. Der Nachweis des chlorotischen Blattflecken-virus des Apfel (Apple chlorotic leaf spot virus), des Stammfurchungs-virus des Apfels (apple stem grooving virus) und des Tomatenzwergebush-virus (tomato bushy stunt virus) mit dem ELISA / E. Fuchs, D. Merker, G. Kegler // Arch. Phytopathol. Pflanzens. — 1981. — 15. — P.421–424.*
12. *Handbook of Plant Virus Diseases / [Dragoljub D. Suttic, Richard E. Ford and Malis T. Tomic]; — USA.: CRC Press, 1999. — 553 p.*
13. *Jelkmann W. An immunocapture-polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus / W. Jelkmann, R. Keim-Konrad // J Phytopathol. — 1997. — 145. — P. 499–504.*
14. *Kinard G. R. Detection of apple chlorotic leaf spot*

and apple stem grooving viruses using RT-PCR / G. R. Kinard, S. W. Scott, O. W. Barnett // Plant Disease. — 1996. — 80. — P.616–621.

15. Kundu J. K. Detection of Apple stem grooving virus in different tissues of apple trees throughout the year / J. K. Kundu, J. Svoboda, J. Polak // Plant Protect. Sci. — 2003. — 39. — P.93–96.
16. M. A. Sökmen. Samsun'da findik (*Corylus avellana* L.) alanlarının elma mozayik virüsü (ApMV) ile bulaşıklık durumunun belirlenmesi / M. A. Sökmen. // Bitki Koruma Bölümü. Samsun. — 2005. — № 3 — p. 22–24

Рекомендував до друку Опалко А. І.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА) В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CORYLUS* L.

Г. А. Тарасенко
Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН Украины

В статье рассматриваются теоретические основы и практическое использование метода иммуноферментного анализа в диагностике вирусов представителей рода *Corylus* L., а также поданы результаты исследований относительно распределения вирусной инфекции среди видов и форм этого рода.

SEROLOGICAL DETECTION OF THE GENUS *CORYLUS* L. REPRESENTATIVES USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).

G. A. Tarasenko
National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine

Theoretical principles and training usage of serological detection of representatives of the genus *Corylus* L. using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are examined in the article. The investigation results as for the distribution of viral infection among the species and forms of representatives of the genus *Corylus* L.