

УДК:578.864

## СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ВІРУСУ ШАРКИ СЛИВИ В УКРАЇНІ

О. В. КУЦЕНКО, аспірант

С. В. ПАВЛОВА, аспірант

І. Г. БУДЗАНІВСЬКА, доктор біологічних наук, професор

ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

E-mail: stahsenia16@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/bio2020.01.001>

**Анотація.** Вірус шарки сливи – збудник небезпечного захворювання кісточкових культур, є карантинним агентом по всьому світу. Вірус діагностований в різних регіонах України, становить серйозну загрозу для садової промисловості і ареали поширення збудника з кожним роком зростають. Метою нашої роботи був моніторинг кісточкових культур на наявність вірусу шарки сливи в Україні, використовуючи серологічні методи діагностики для встановлення розповсюдженості вірусу шарки сливи та подальшого вивчення молекулярно-епідеміологічних особливостей збудника, отримання специфічної діагностичної сироватки. Для ранньої та широкомасштабної діагностики кісточкових культур спершу отримали специфічну діагностичну сироватку для виявлення всіх штамів вірусу шарки сливи. Специфічність отриманої сироватки підтвердили за допомогою імуноелектроблотингу. Отриману сироватку використовували для проведення непрямого імуноферментного аналізу, також для діагностики використовували імуноферментний аналіз („сендвіч”) комерційної тест-системи виробництва Loewe (Німеччина). В результаті вірус шарки сливи був виявлений в шести областях України, рівень ураження кісточкових культур з досліджуваних регіонів становить 30%, що є серйозною загрозою для садової промисловості нашої країни, та потребує подальшої молекулярно-генетичної діагностики.

**Ключові слова:** вірус шарки сливи, серологічна діагностика, діагностична сироватка, Україна

**Актуальність.** Вірус шарки сливи — це карантинний вірус, який є надзвичайно патогенним для кісточкових видів рослин і викликає епідемії та значні економічні витрати в низці країн (García, 2014). Вірус поширений на території України, але вивчення його поширення, молекулярно-біологічних особливостей, штамового різноманіття, молекулярної епідеміології є недостатнім (Chirkov, 2016). Збудник є серйозною загрозою як для малих садових господарств,

так і для великих посадкових територій, тому важливим є вчасна діагностика та створення ефективних профілактичних заходів для боротьби з патогеном (Subr, 2013).

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Вірус шарки сливи поширений переважно у всіх частинах світу. На території України він уперше був виявлений в 1966 році в Чернівецькій області (Ратушняк, 2003). Потім у 1969 році незначні спалахи захворювання спостерігали в Чернівецькій,

Львівській, Закарпатській, Тернопільській, Івано-Франківській та Вінницькій областях. Станом 2008 рік вогнища враження виявлено в 6 регіонах (Закарпатська, Львівська, Тернопільська, Чернівецька, Одеська області) загальною площею 4543, 9 га. (Budzanivska, 2011, Kutyshenko, 2017). Сьогодні спалахи захворювання виявлені в Закарпатській, Львівській, Тернопільській, Чернівецькій, Вінницькій, Одеській, Київській, Черкаській, Харківській областях, а частина регіонів є не досліджуваними. Встановлено, що в досліджуваних регіонах України циркулюють українські ізоляти, які належать Dideron та Marcus штамам (Kondratenko, 2006). Боротьба з вірусом полягає в знищенні уражених рослин, що призводить до значних економічних втрат. Створити систему профілактичних заходів проти вірусних хвороб неможливо без врахування видового складу, молекулярно-біологічних особливостей збудника хвороб.

**Мета дослідження** – проведення серологічної діагностики та отримання специфічної діагностичної сироватки для моніторингу кісточкових культур на присутність ВІС в Україні. Специфічну сироватку до вірусу шарки сливи використовували для подальшої серологічної діагностики кісточкових культур.

**Матеріали та методи.** Матеріалом служували зразки з приватних господарств Київської, Черкаської, Одеської, Харківської, Вінницької, Івано-Франківської областей, відібрані у весняно-літній період 2016 – 2018 рр. Зразки листя слив, абрикос, персиків, аличі, вишні, черешні відбирали за візуальними симптомами, а саме: хлоротичні плями або кільця, деформація листків та просвітліні жилки, дрібні кільця або виразки на плодах, іноді з коричневою або червонуватою невротизацією. З отриманого супернатанту зразку абрикоси Київської області готували препарат для електронної мікроскопії. З отриманого супернатанту зразку

абрикоси Київської області готували препарат для електронної мікроскопії, морфологію вірусу досліджували на електронному мікроскопі Jeogs, використовуючи 2 %-й ураніл ацетат.

Для діагностики досліджуваного ізоляту вірусу шарки ми провели низку маніпуляцій для отримання специфічної антисироватки до вірусу шарки сливи. Для накопичення вірусу вірусу шарки використовуємо зразок з абрикоси Київської області, який було успішно перенесено на трав'янистий індикатор *Nicotiana bentamiana*. Для перенесення використовували фосфатно-сольовий буфер рН 8 (з додаванням 1 % нікотину, 0,25 % діетилдитіокарбому натрію, 0,2 % сульфат натрію). Під час його застосування була отримана найбільша кількість уражених рослин *Nicotiana bentamiana*, вірус на 7 день після інюляції на натертих листках утворював симптоми у вигляді хлорозів та скручування листової пластинки. Потім отримали очищений препарат вірусу шарки сливи, для імунізації кроля. Очищення вірусу проводили на 20-30 день після пасажу з інфікованих рослин. Щоб отримати очищений препарат вірусу шарки використовували протокол за Schade (1969). Гомогенізували 100 г системно інфікованих рослин *Nicotiana bentamiana* в 300 мл. дистильованої води, що містить 0,3% аскорбінової кислоти та 0,01 М натрій діетилдитіокарбамат (DIECA). Отриманий гомогенізатор струшуємо протягом 5 хв. з рівним об'ємом охолодженого хлороформу. Центрифугуємо протягом 15 хв. 1000 об./хв. та 15хв. 5000 об./хв., зберігши водну фазу на кожному кроці. Концентруємо вірус одним циклом із високою та низькою швидкістю центрифугування, ресуспендуємо вірус у 0,05 М боратного буферу, рН 8,2. Рослинні білки можуть бути видалені адсорбцією зі специфічної антисироватки. Оскільки, вірусний препарат виявився недостатньо очищеним, ця методика була модифікована. Така обробка дала можливість очистити препарат під час другого центрифугування від низькомо-

лекулярних білків і сприяла кращому екстрагуванню вірусних частин зі зруйнованих рослинних клітин інфікованих листків. Очищені препарати в подальшому були використанні для імунізації тварин. Для імунізації використовували кроля породи шиншила віком 1–1,5 роки, вагою 2–3 кг. Отримали специфічну сироватку до вірусу шарки сливи, використовуючи трьохразову імунізацію кроля. Через 8 днів після останньої інюкуляції здійснили забір крові (прижиттєвий) з вени вушної раковини тварини в об'ємі 15 мл. У подальшому отримали очищену сироватку шляхом низько швидкісного центрифугування 2 тис об./хв. упродовж 5 хв. Сироватку зберігаємо за -20 °С по 30 мкл. в епендорфах. Серологічну діагностику проводили використовуючи імуноферментний аналіз („сендвіч”) комерційної тест-системи виробництва Loewe (Німеччина) у 96-лункових полістиролових планшетах із застосуванням сироватки до вірусу шарки сливи (Cambra, 1994) та непрямий імуноферментний аналіз, використовуючи отриману специфічну діагностичну сироватку. Результати ІФА враховували за допомогою рідеру марки “Multiscan” MCC, модель 340 Р за довжини хвилі 405 нм.

Методом непрямого імуоферментного аналізу визначили титр та робоче розведення сироватки, як антиген використовували очищений вірус. За допомогою імуоелектроблотингу визначили специфічність сироватки. У подальшому дослідженні зразки діагностували методом непрямого імуоферментного аналізу, використовуючи специфічну сироватку до ВШС.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Зразки листя та плодів уражених рослин роду *Prunus* відбирали за візуальними симптомами: хлоротичні плями або кільця, деформація листків та просвітліні жилки, дрібні кільця або виразки на плодах. Інколи спостерігали розмиті прожилкові плями або кільця на всій поверхні листової пластинки, що мали світло-зелене або жовто-зелене забарвлення. Плями розташовувались упродовж жилок і на краях листової пластинки, вони добре проглядалися на світлі, у центрі плям тканини листка зберігали нормальний зелений колір (рис. 1.).

Відібрані зразки діагностували на наявність вірусу шарки сливи серологічними, електронно-мікроскопічними та молекулярними методами. Для приготування пре-



Рис. 1. А – симптоми PPV на листі сливи з Одеської області, В – симптоми PPV на плодах абрикос із Київської області

парату електронної мікроскопії використовували зразок абрикоси з Київської області, який було перевірено на наявність ВШС за допомогою ЗТ-ПЛР. Отримано продукт ампліфікації 243 пар основ. В препаратах електронної мікроскопії виявляли типові для вірусу шарки ниткоподібні частини завдовжки 700-800 нм, що за морфологічними характеристиками відповідає вірусу шарки сливи (рис. 2.).

За допомогою спектрофотометра визначили концентрацію вірусу та рівень його очистки. Вихід вірусу після очищення складав від 0,6 до 0,8 мг / 100 г листків.

Виділення та очищення вірусного препарату проводили шляхом диференційного центрифугування, встановили співвідношення A260:A280, де A260 та A280 – коефіцієнти поглинання нуклеїнових кислот та амінокислот. Коефіцієнт екстинції для вірусу шарки сливи становить 1.3.

Отримали специфічну сироватку до вірусу шарки сливи для подальшого використання в ІФА. Було встановлено, що для достовірної ідентифікації вірусу шарки методом імуоферментного аналізу потрібно використовувати робоче розведення 1 : 3000, а титр становить 1 : 8000 (рис. 3.). Специфічність отриманої сироватки підтвердили за допомогою імуоелектробло-

тингу. Спостерігали чітку смугу на нітроцільюльозній мембрані, що відповідає молекулярній масі капсидного білку ВШС.

Штами одного й того ж вірусу здатні викликати різні симптоми на рослинах одного виду, змінюючи водночас зовнішні прояви від надчутливості до безсимптомного прояву інфекції. На прояв симптомів можуть впливати умови вирощування рослин і наявність супровідної інфекції, що є досить розповсюдженим явищем у разі вірусного ураження кісточкових культур. Тому наявність вірусної інфекції краще підтверджувати більш специфічними методами діагностики, зокрема серологічними. Загалом було протестовано приблизно 300 зразків у весняно-літній період 2016 – 2019 рр. кісточкових культур із шести регіонів України. Вірус шарки сливи був виявлений на персику, абрикосі, аличі, сливі, черешні та мигдалі (рис. 4.).

Отже, у результаті серологічної діагностики в усіх досліджуваних регіонах виявлено наявність вірусної інфекції на кісточкових культурах, рівень ураження рослин становить 30 %.

**Висновки і перспективи.** Серологічна діагностика необхідна для масштабного аналізу інфікування плодів культур вірусними захворюваннями на території України.

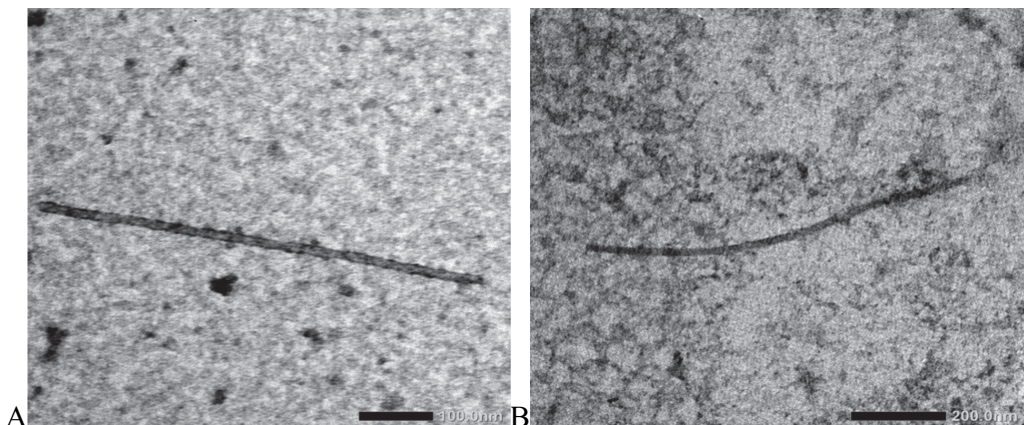


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне зображення зразку вірусу шарки сливи Київської області (А – Бар –100 нм., В – Бар – 200 нм).



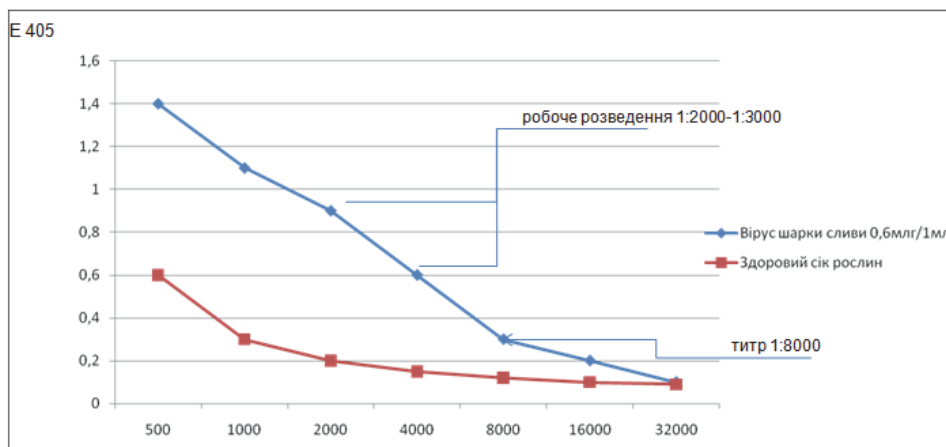


Рис. 3. Результати титрування антисироватки до ВШС, робоче розведення 1 : 3000, титр 1 : 8000

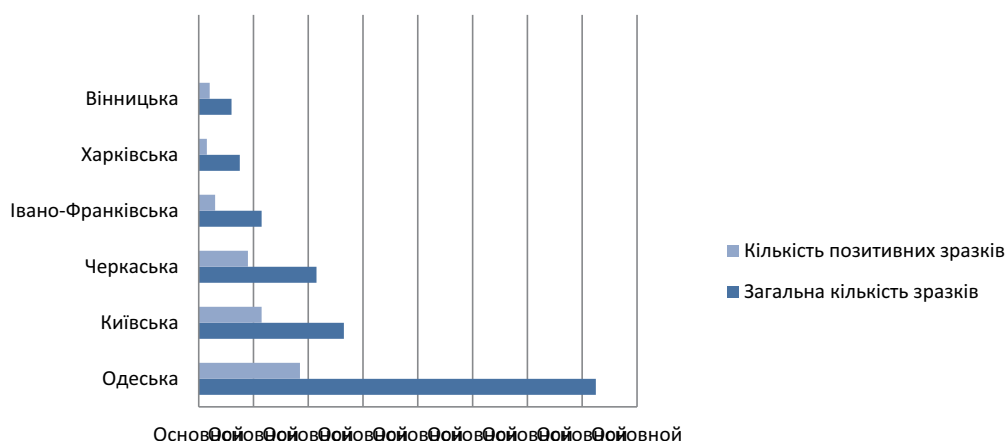


Рис. 4. Серологічна діагностика вірусу шарки сливи в досліджуваних регіонах України

Отримали специфічну діагностичну сироватку до вірусу шарки сливи. У результаті дослідження вірус шарки сливи виявили в шести регіонах України, рівень ураження рослин становить 30 %. У подальшому всі

позитивні зразки будуть діагностуватися за допомогою молекулярно-генетичних методів, для встановлення штамового різноманіття та характеристики молекулярної епідеміології збудника на території України.

## Література

1. García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. Mol Plant Pathol. 2014. Vol. 15, №5. P. 226-241
2. Chirkov S, Ivanov P, Sheveleva A, Kudryavtseva A, Prikhodko Y, Mitrofanova I. Occurrence and characterization of plum pox virus strain D isolates from European Russia and Crimea. Arch Virol. 2016. Vol. 161, №2. P. 425-430
3. Subr Z, Glasa M. Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics. Acta Virol. 2013. Vol. 57 (2). - P. 217-228

4. Ратушняк Л. К. Розповсюдженість шарки сливи в Україні. Вісник аграрної науки південного регіону. Сільськогосподарські та біологічні науки. 2003. Вип. 4. С. 156–163.
5. Budzanivska I, Usko L, Gospodaryk A, Melnyk M, Polischuk V. Epidemiology of sharka disease in Ukraine. *Acta Hort.* 2011; 899: P 57-63.
6. Kyrychenko A, Shcherbatenko I, Antipov I, Hrynychuk K. Typing of Plum pox virus isolates in the central Ukraine. *Microbiol J.* 2017; 79(3):115-124.
7. Kondratenko P, Udovichenko V. Plum pox virus (PPV) in Ukraine. *Bulletin OEPP EPPO Bulletin.* 2006; 36:217.
8. Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Pérez E., Camarasa E., García J.A., Moya J.J., López-Abella D., Vela C. & Sanz A. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 1994. V. 24. P:569–577.

## References

1. García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T. (2014) Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol Plant Pathol.* 15(3):226-41. doi: 10.1111/mpp.12083.
2. Chirkov S, Ivanov P, Sheveleva A, Kudryavtseva A, Prikhodko Y, Mitrofanova I. (2016) Occurrence and characterization of plum pox virus strain D isolates from European Russia and Crimea. *Arch Virol.* 161(2):425-30. doi: 10.1007/s00705-015-2658-x.
3. Subr Z, Glasa M. (2013) Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics. *Acta Virol.* 57(2):217-28. doi: 10.4149/av
4. Ratushnyak L. K. (2003). Rozpovsyudzhennist' sharky slyvy v Ukrayini. [The distribution of Plum pox virus in Ukraine]. *Bulletin of agricultural science of the southern region. Agricultural and biological sciences*. 4. 156–163.
5. Budzanivska I, Usko L, Gospodaryk A, Melnyk M, Polischuk V. (2011) Epidemiology of sharka disease in Ukraine. *Acta Hort.* 899: 57-63.
6. Kyrychenko A, Shcherbatenko I, Antipov I, Hrynychuk K. (2017) Typing of Plum pox virus isolates in the central Ukraine. *Microbiol J.* 79(3):115-124.
7. Kondratenko P, Udovichenko V. (2006) Plum pox virus (PPV) in Ukraine. *Bulletin OEPP EPPO Bulletin.* 36:217.
8. Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Pérez E., Camarasa E., García J.A., Moya J.J., López-Abella D., Vela C. & Sanz A. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 1994. V. 24. P:569–577. doi:org/10.1111/j.1365-2338.1994.tb01070.x

## SUMMARY

**O. Kutsenko, S. Pavlova, I. Budzanivska. SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF PLUM POX VIRUS IN UKRAINE.** *Biological Resources and Nature Managment.* 2020. 12, №1–2. P.5–11. <https://doi.org/10.31548/bio2020.01.002>

**Abstract.** Plum pox virus is causative agent of stone fruit trees disease and is a quarantine agent worldwide. The virus is widespread in different regions of Ukraine, possesses a serious threat to the garden industry and the distribution of the pathogen grows every year. The purpose of our work was to monitor stone fruit cultures for the presence of plum virus in Ukraine, using serological diagnostic methods to determine the prevalence of plum pox virus and further study the molecular and epidemiological features of the pathogen, and to obtain specific diagnostic serum. Firstly, a specific diagnostic serum for detection all strains of plum pox virus was obtained for

early and large-scale diagnosis of stone fruit cultures. The specificity of the obtained serum was confirmed by immunoelectroblotting. The resulting serum was used for indirect enzyme-linked immunosorbent assay, as well as for immunoassay ("sandwich") of a commercial test system manufactured by Loewe (Germany). As a result, plum pox virus was detected in six regions of Ukraine, the part of infected plants of stone fruit trees from the studied regions is 30%, which is a serious threat to our country's horticultural industry, and needs further molecular genetic diagnostics.

**Keywords:** plum pox virus, serological diagnostics, diagnostic serum, Ukraine

## АННОТАЦІЯ

О. Куценко, С. Павлова, И. Будзанівська .СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ В УКРАИНЕ. Биоресурсы и природопользование. 2020. 12, №1–2. Р.5–11. <https://doi.org/10.31548/bio2020.01.002>

**Аннотация.** Вирус шарки сливы – возбудитель опасного заболевания косточковых культур, является карантинным агентом по всему миру. Вирус распространен в различных регионах Украины, представляет серьезную угрозу для садовой промышленности и ареалы распространения возбудителя с каждым годом растут. Целью нашей работы был мониторинг косточковых культур на наличие вируса шарки сливы в Украине, используя серологические методы диагностики для установления распространенности вируса шарки сливы и дальнейшего изучения молекулярно-эпидемиологических особенностей возбудителя, получение специфической диагностической сыворотки. Для ранней и широкомасштабной диагностики косточковых культур сначала получили специфическую диагностическую сыворотку для выявления всех

штаммов вируса шарки сливы. Специфичность полученной сыворотки подтвердили с помощью иммуноэлектрофореза. Полученную сыворотку использовали для проведения непрямого иммуноферментного анализа, а также для диагностики использовали иммуноферментный анализ («сэндвич») коммерческой тест-системы производства Loeys (Германия). В результате вирус шарки сливы был обнаружен в шести областях Украины, уровень поражения косточковых культур из исследуемых регионов составляет 30 %, что является серьезной угрозой для садовой промышленности нашей страны, и требует дальнейшей молекулярно-генетической диагностики.

**Ключевые слова:** вирус шарки сливы, серологическая диагностика, диагностическая сыворотка, Украина