

Н.В.ТРЯПЩИНА, кандидат с.-г. наук
Т.В.МЕДВЕДЕВА, кандидат біол. наук
Інститут садівництва (ІС) НААН, Київ, Україна

МЕТОД КОНТРОЛЮ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПОКРИВНОГО БІЛКА ВІРУСІВ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ ХЕМОТЕРАПІЇ В КУЛЬТУРІ IN VITRO

N.V.TRYAPITSYNA, T.V.MEDVEDYEVA, PhDs
Institute of Horticulture, UAAS, Kyiv, Ukraine

METHOD OF THE CONTROL OVER THE VIRUS COAT PROTEIN CONCENTRATION AT DIFFERENT CHEMOTHERAPY STAGES IN VITRO

Оцінено зміни концентрації покривного білка вірусу шарки сливи методом класичного та напівкількісного імуноферментного аналізу (ІФА). Проведено математичну апроксимацію функції падіння концентрації вірусів в експлантах під дією салицилової кислоти. Проаналізовано можливі шляхи оптимізації схеми оздоровлення експлантів сливи сорту Ненька від вищевказаного вірусу.

Оценены изменения концентрации покровного белка вируса шарки сливы методом классического и полуколичественного ИФА. Проведена математическая аппроксимация функции падения концентрации вирусов в эксплантах под действием салициловой кислоты. Проанализированы возможные пути оптимизации схемы оздоровления эксплантов сливы сорта Ненька от вышеуказанного вируса.

The changes in the concentration of the plum pox virus coat protein were evaluated by means of classical and semi-quantitative ELISA. The authors conducted mathematical approximations of virus reduction function in explants under the influence of the salicylic acid treatment. Possible ways of the optimizing the chemotherapy schemes for the plum variety Nen'ka explants were analyzed.

Створення бази клонів, вільних від вірусів є важливим завданням при переведенні вітчизняного садівництва на безвірусну основу. Відбір базових клонів проводиться у відповідності до схем сертифікації. Вони є специфічними для кожної культури, але всі проходять через такі стандартні етапи, як відбір материнської рослини – кандидата в базові клони певного сорту за помологічними ознаками та багатоступеневу перевірку її фітовірусологічного статусу. На жаль, для деяких сортів плодових і ягідних культур виділення безвірусних клонів уже сьогодні проблематичне. Адже неконтрольований обмін садивним матеріалом та нехтування технологічними вимогами до утримування різних типів насаджень призводить до широкого поширення в них вірусних інфекцій. Найчастіше це відбувається саме з перспективними сортами, садивний матеріал яких обмінюють найбільш інтенсивно. Це робить **актуальним** запровадження у практику виробництва високоефективних та економічних схем оздоровлення. Оптимізацію цього процесу можна проводити лише з використанням методів, які дозволяють відслідковувати динаміку змін концентрації вірусу. Адже важливими є не тільки елімінація вірусу сама по собі, але й характер та послідовність процедур, які дають можливість досягти цього ефекту, оскільки схеми оздоровлення мають бути оптимальними за тривалістю, ресурсозатратністю і впливом на життєздатність рослин.

Технології виробництва оздоровленого садивного матеріалу багатьох видів культурних рослин базуються на комплексному застосуванні методів відбору безвірусних зразків, культури апікальних меристем, термо- та хемотерапії. Остання є одним з найновіших методів елімінації вірусів і широко застосовується в комбінуванні з мікроклональним розмноженням.

Тому **метою** наших досліджень була оцінка можливості знищення вірусу шарки сливи в інфікованих рослинах методом хемотерапії *in vitro* з використанням саліцилової кислоти як віроцида.

Методика. Робота виконувалась у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва НААН протягом 2011-2012 рр. Об'єктом дослідження служили рослини сливи (*Prunus domestica* L.) сорту Ненька. Ініціювання культури *in vitro* було проведено з використанням верхівкових та пазушних бруньок. Як стерилізуючий агент вживали сулему (0,1% HgCl_2) і 70%-й етанол. Експозиція стерилізації складала 1-3 хвилини. На етапі введення в культуру та проліферації застосовували модифіковане живильне середовище Мурасіге – Скуга з додаванням вітамінів та фітогормонів, рН = 5,5-5,7. Експланти культивували протягом 16-годинного світлового дня з освітленням 2000 – 2500 лк при $t^\circ=23-25^\circ \text{C}$ і вологості повітря 50-60%. Інфіковані лінії розмножених пагонів були використані як вихідний матеріал для хемотерапії *in vitro*.

Саліцилову кислоту (СК) (20 і 40 мг/л) стерилізували через мембранний фільтр ($d = 0,22\mu\text{m}$) і додавали в середовище після автоклавування. У контрольний варіант антивірусний препарат не включали. Тривалість пасажу складала 30 днів. На кожен варіант було використано по десять мікропагонів.

Ідентифікація вірусу. Для оцінки впливу різних концентрацій віроциду на вміст вірусу шарки сливи в експлантах досліджуваного сорту ідентифікацію вірусу проводили методом класичного [2] та напівкількісного [8] ІФА з використанням поліклональних антитіл виробництва Loewe Phytodiagnostica (Німеччина). Для реєстрації результатів застосовано мікропланшетний імуноферментний спектрофотометр STAT FAX 2100, США. При тестуванні матеріалу з культури *in vitro* відбирали частину експланта, не занурену в середовище. Розведення проби в гомогенаті дорівнювало 1:100.

Оцінка зміни концентрації покривного білка досліджуваного вірусу. Для виявлення методом напівкількісного ІФА титру (t) покривного білка вірусу, який є пропорційним кількості вірусних частинок у пробі, було виконано серію послідовних двократних розведень соку рослини (від 1:2 до 1:1024) у фосфатному буфері. Найвищим титром антигена в цій серії вважали той, який давав достовірне відхилення від негативного контролю. Таким відхиленням вважали дворазове збільшення екстинкції зразка по відношенню до екстинкції негативного

контролю. Відповідно концентрацію покривного білка (с) можна обчислити за такою формулою:

$$c = k / t, \quad (1)$$

де с - концентрація покривного протеїну вірусу;

t – титр покривного протеїну;

k – константа ферментативної реакції, яка при імуноферментному аналізі з метою виявлення певного вірусу є однаковою для всіх зразків.

Оцінити відносні зміни концентрації вірусного покривного білка або який відсоток складає вона в експериментальному зразку у порівнянні з контрольним можна таким чином:

$$c_i / c_k = (1/t_i) \cdot 100\% / (1/t_k) \quad (2)$$

$$c_i / c_k = t_k \cdot 100\% / t_i \quad (3)$$

За даними класичного імуноферментного аналізу були також обчислені показники концентрації вірусного покривного білка за формулою:

$$A = \frac{OD_{\text{expi}} - OD_{\text{contr-}}}{OD_{\text{contr+}} - OD_{\text{contr-}}} \%, \quad (4)$$

де $OD_{\text{contr+}}$ - екстинкція контрольного вірус-інфікованого зразка;

$OD_{\text{contr-}}$ - екстинкція контрольного здорового зразка;

OD_{expi} - екстинкція *i*-го експериментального зразка.

Апроксимацію функцій та розрахунок коефіцієнтів детермінації проведено у програмі Excel.

Результати досліджень. Захворювання, котре викликає вірус шарки сливи (ВШС), є одним з найбільш серйозних у кісточкових культур, в тому числі сливи [6]. Вивчення перспективних сортів цієї культури у вітчизняних насадженнях свідчать про досить високу чутливість деяких з них до інфікування вищезгаданим вірусом. За узагальненими багаторічними даними одним з найбільш атрактивних для нього сортів сливи вітчизняної селекції є Ненька, який, вочевидь, поступається перед іншими сортами за ефективністю механізмів резистентності і тому потребує особливої уваги.

Як уже сказано, в нашій роботі було оцінено відносні зміни кількості покривного білка вірусу шарки сливи в рослинному матеріалі цієї культури на різних етапах хемотерапії методами напівкількісного та класичного імуноферментного аналізу. Виявлено, що для першого з них зміна концентрацій найкращим чином узгоджується з логарифмічною функцією. На обох діаграмах рисунку 1 видно, що як у першому (А), так і у другому (В) варіантах основне падіння концентрації білка відбувається протягом перших трьох пасажів. На останньому, четвертому, потенціал терапевтичної дії СК в обох концентраціях стабілізується.

При додаванні більшої кількості СК у живильне середовище швидкість падіння концентрації вірусного протеїну була значно більшою, особливо на першому пасажі. Якщо при вмісті СК у середовищі 20 мг/мл через місяць культивування зниження концентрації поверхневого білка не відбувалося зовсім, то при внесенні 40 мг/мл СК кількість вірусів в експлантах зменшувалася до 33%. На другому пасажі (після 2-х місяців культивування) вміст покривного білку між варіантами різнився удвічі. На двох останніх етапах достовірної різниці між двома варіантами із застосуванням напівкількісного ІФА не виявлено.

Коефіцієнт детермінації (R^2) свідчить, що у варіанті з вмістом СК в середовищі 20 мг/л ефект падіння концентрації більш як на 96% залежить від тривалості дії віроциду. У варіанті з СК 40 мг/л вона забезпечує близько 89% хемотерапевтичного ефекту. Іншими словами, реалізація віроцидної дії саліцилової кислоти для елімінації вірусу шарки сливи в сорту Ненька повніше відбувається за її концентрації в середовищі 20 мг/л. При вищому вмісті СК зменшення кількості покривного білку проходить швидше. Але ця концентрація препарату спричиняє більший стрес у рослинній клітині, тому не виключено, що в ній можуть включатися механізми, спрямовані на обмеження активності СК.

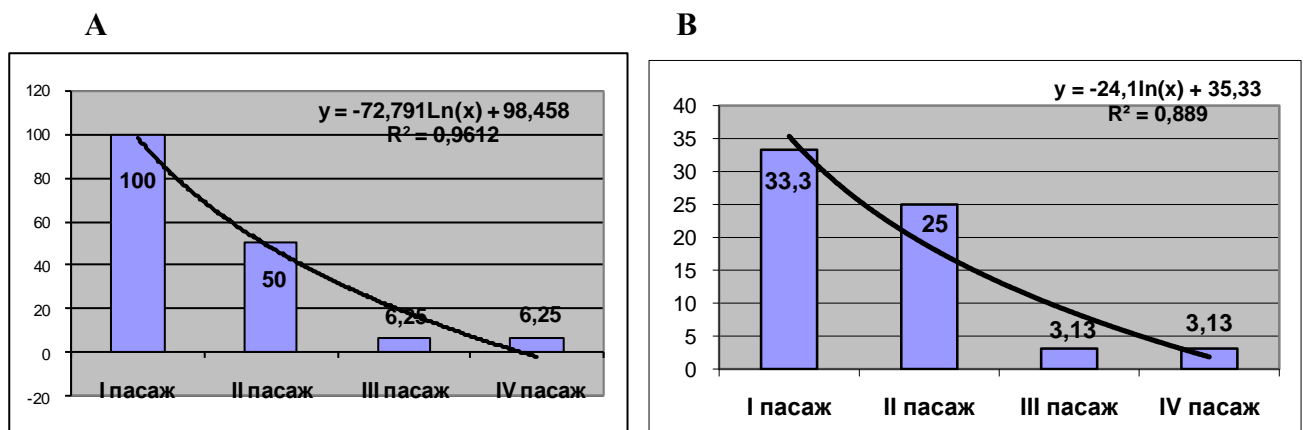


Рис.1. Зміни концентрації покривного білка (%) в експлантах під дією саліцилової кислоти, обчислені за даними напівкількісного ІФА по варіантах досліді: А- СК 20, В – СК 40 мг/л

Дію саліцилової кислоти пов'язують з досить широким спектром механізмів. Доведено, що ця сполука може гальмувати всі три основні етапи вірусної інфекції: реплікацію вірусу, його міжклітинний рух та переміщення на довгі дистанції по судинній системі [9]. Крім цього, їй приписують вплив на посилення антивірусної резистентності, завдяки активації мікро-РНК та підвищенню експресії рослинних генів, продукти яких беруть участь у захисних механізмах рослини проти патогенів [4]. Але для кожної патосистеми «вірус»-«господар» антивірусна стратегія цього препарату може бути індивідуальною. Не виключено також, що на співвідношення між задіяними механізмами може впливати і рівень інфікування рослини [9].

Максимально наближеною до даних, обчислених на базі класичного ІФА, виявилася спадна експоненційна функція, котра вказує на те, що концентрація вірусного білка падає за

геометричною прогресією пропорційно тривалості дії антивірусного препарату, тобто кількості пасажів. При цьому з кожним пасажем швидкість падіння вповільнюється. Між показниками концентрації вірусного білка у першому варіанті з вмістом у середовищі СК 20 мг/л (рис. 2 А) достовірної різниці між першим і другим, третім і четвертим пасажами не було, а у другому варіанті з додаванням СК в кількості 40 мг/л достовірна різниця між послідовними пасажами не спостерігалася взагалі. Обчислені по кожному варіанту коефіцієнти детермінації свідчили про дещо слабшу залежність кінцевого результату від тривалості культивування на фоні дії СК в порівнянні з попередніми розрахунками, зробленими на основі напівкількісного ІФА.

Доведено, що саліцилова кислота здатна обмежувати рух вірусу шарки сливи і, таким чином, локалізувати осередки інфекції в інфікованій рослині, а також посилювати її резистентність до вірусу впливаючи на механізм захисту через РНК-залежне «мовчання» генів. Обидва ці механізми діють у комплексі [1].

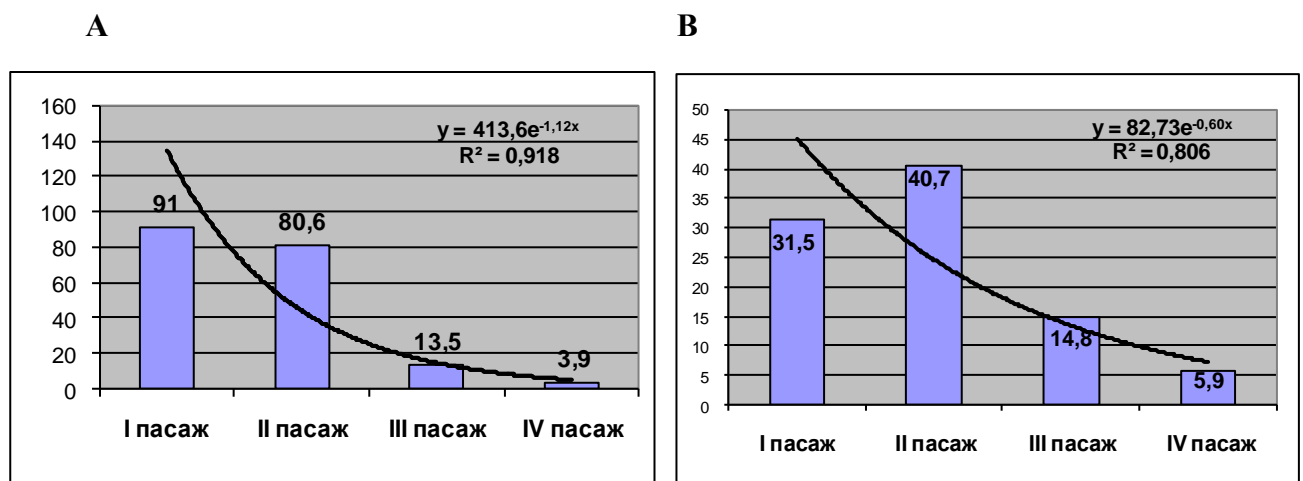


Рис. 2. Зміни концентрації покривного білка (%) в експлантах під дією саліцилової кислоти, обчислені за даними класичного ІФА у варіантах досліджу: А- СК 20, В – СК 40 мг/л

Відомо, що локалізація ВШС в рослині може бути нерівномірною - його кількість в різних тканинах та органах може істотно різнитись [3, 7]. Крім цього, з огляду на вже згадану здатність СК локалізувати осередки вірусної інфекції відбір рослинного матеріалу для подальшого культивування після хемотерапії та для тестування є критичним етапом, який потребує оптимізації. На нашу думку, дещо суперечливі дані, отримані при вмісті СК у середовищі 40 мг/л, можуть бути наслідком нерівномірного розповсюдження ВШС в рослинах.

Інші автори [5] також відмічали, що для знищення вірусу шарки в експлантах сливи при поєднанні хемотерапії та культури меристем важливими факторами є як доза антивірусного препарату, так і розмір меристеми, який забезпечує достатній рівень регенерації експлантів та редукції вірусу. Тому ці чинники слід враховувати для оптимізації методики оздоровлення експлантів сливи від ВШС.

За результатами проведеної дослідної роботи можна зробити такі **висновки**.

1. Падіння концентрації вірусу шарки сливи в експлантах сливи сорту Ненька під дією СК найкращим чином характеризує логарифмічна функція, побудована за даними напівкількісного ІФА.

2. Зміни вмісту покривного білка вірусу, за оцінкою методами класичного та напівкількісного ІФА, залежать від тривалості дії віроциду. Відсутність достовірної різниці між концентрацією вірусу в рослинах на останніх двох пасажах свідчить про те, що схему антивірусної терапії доцільно відкоригувати після третього.

3. У схемі оздоровлення досліджуваного сорту від ВШС методом хемотерапії в поєднанні з культурою меристеми доцільно оптимізувати розміри рослинних експлантів при відборі матеріалу для тестування та культивування на середовищі з віроцидом.

Список використаної літератури

1. Alamillo J.M. Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defence mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco / J.M. Alamillo, P. Saénz, J. A. García // *The Plant Journal* . - 2006. - № 48(2). – P. 217-227.
2. 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. – №3. – P.475-483.
3. Elibuyuk I.O. Investigation of Plum pox virus in different tissues of apricot and plum trees /I.O. Elibuyuk// *Plant Pathology Journal.* – 2006. - № 5.- P. 208-211.
4. Galis I. Salicylic acid-, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris* / I. Galis, J. L. Smith, P.E. Jameson // *Journal of Plant Physiology* . - 2004. - № 161(4). – P. 459-466.
5. Jakab-Ilyefalvi Zs. Results regarding the classical and modern pathogen elimination techniques of Plum pox virus at plum (*Prunus domestica* L.) /Zs. Jakab-Ilyefalvi, D. Pamfil// *Annals of RSCB* . – 2011. - №16(1). – P.292-305.
6. Labonne G. Epidemiology of sharka disease in France / G .Labonne, S.Dallot// *EPPO Bulletin.*–2006.–№ 36. –P. 267–270.
7. Martínez-Gómez P. Distribution of coat protein and nucleic acid of Plum pox virus (PPV) in seedlings of peach rootstock GF305 and apricot cv. Real Fino / P. Martínez-Gómez, F. Dicenta// *Phytopathol. Mediterr.* – 2001. - № 40. – P. 157–164.
8. Polák J. Identification of interspecific *Peach* and *Prunus sp.* Hybrids resistant to Plum pox virus infection /J. Polák, I.Oukropec// *Plant Protect. Sci.* – 2010. -№46(4). – P.139–144.
9. Singh D. P. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid / D. P. Singh, C. A. Moore, A.Gilliland, J. P. Carr // *Molecular Plant Pathology.* -2004. - №5(1). – P. 57-63.

Одержано редколегією 12.07.12