

УДК 634.75 : 632.38 : 577.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НЕКОТОРЫХ ГРУПП ВИРУСОВ ЗЕМЛЯНИКИ

О.О. БЕЛОШАПКИНА, Н.В. АРШАВА

(Кафедра фитопатологии, лаборатория молекулярной
вирусологии ВНИИСБ)

Проводились исследования по диагностике фитовирусов родов карла-, потеке- и неповирусов в растениях земляники методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработана методика выделения тотальной РНК из тканей земляники, экспериментально подобраны режимы амплификации. Приводятся результаты сравнения достоверности тестирования вирусов земляники двумя методами: ПЦР и индикаторным.

Диагностика вирусов земляники отличается большой сложностью. Практически все сорта являются бесимптомными носителями вирусов, и их визуальная диагностика невозможна; основные специфические вирусы, поражающие эту культуру, нестойки вне клетки растения, частицы их необратимо разрушаются либо в экстрактах сока, либо в процессе очистки [3, 7]. Получение антисывороток к таким вирусам для проведения серодиагностики затруднено, и их тестируют обычно методом прививки на растениях-индикаторах, длительно, с использованием больших тепличных площадей. Поэтому необходимо совершенствовать диагностику вирусов земляники с использованием современных молекулярно-биологических методов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является оригинальным методом экспоненциального увеличения (амплификации) специфической последовательности ДНК *in vitro* с помощью ДНК-синтеза [9]. У подавляющего числа фитовирусов носителем генетической информации является РНК [1]. В таком случае РНК слу-

жит матрицей для ревертазы в процессе обратной транскрипции, и образующиеся кДНК (комплементарные ДНК) подвергаются стандартной амплификации. Это происходит с помощью термостабильной ДНК — полимеразы (Taq — polymerase), которая осуществляет синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух олигонуклеотидных праймеров (затравок).

Каждая из вновь синтезируемых молекул ДНК с помощью одного из праймеров служит матрицей для синтеза комплементарной ДНК с помощью другого праймера. Для этого денатурируют образовавшиеся в результате первой стадии реакции двухцепочечные молекулы ДНК, дают возможность праймерам комплементарно присоединиться к ДНК и осуществляют элонгацию [10]. Эти три операции составляют цикл ПЦР и приводят к удвоению (а впоследствии к экспоненциальному росту) количества молекул ДНК в образце. Недостатками, присущими ПЦР, являются необходимость наличия информации о последовательности РНК вируса, синтез соответствующей

щих праймеров, наличие специального оборудования и материалов, что делает метод достаточно дорогим. Однако избирательность, скорость, высокая чувствительность и многосторонность ПЦР играют первостепенную роль для перспективы его широкого применения в фитопатологии. Хотя в настоящее время метод не используется в практическом растениеводстве. Имеются сведения [7, 8, 11, 12] об успешных испытаниях методов полимеразной цепной реакции и гибридизации нуклеиновых кислот для диагностики вирусов слабого пожелтения краев листьев и окаймления жилок земляники.

При производстве оздоровленного безвирусного посадочного материала особый практический интерес представляет тестирование земляники на отсутствие не каких-то отдельных вирусов, а по возможности всех. При этом точная идентификация их вовсе не обязательна. Землянику поражают вирусы, относящиеся в основном к следующим родам: *Rhabdovirus*, *Car.lavirus*, *Potexvirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Ilarvirus*, *Caulimovirus*. Для большинства представителей практически всех этих групп имеется полная информация о нуклеотидной последовательности их геномов.

Совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной вирусологии Института биотехнологии РАСХН (ВНИИСБ) нами была поставлена задача испытать возможность диагностики вирусов земляники, относящихся к родам потеке-, карла- и неповирусы, методом ПЦР, данная работа выполнялась в 2001-2003 гг. Принцип рассматриваемого метода основан на выявлении общих для всех представителей каждой группы (рода) вирусов гомологичных участков генома, синтезе соответствующих вырожденных праймеров и ам-

плификации определенных участков ДНК в ПЦР.

Начальным этапом анализа является пробоподготовка, т.е. выделение тотальной РНК из растительных тканей. Выделение тотальной РНК из листьев земляники проводили различными методами: традиционной фенольной депротенинизацией, с использованием сорбента SiO_2 , колонок фирмы QIAGEN и методом П. Хомчинского [5, 6].

Первоначально использовали традиционный метод фенольной депротенинизации с последующей преципитацией РНК спиртом и хлоридом лития. Для выделения РНК из земляники данная методика оказалась неэффективной, т.к. в полученном таким образом осадке кроме РНК содержалось большое количество других полимерных молекул-загрязнителей (контаминантов). Появление осадка объясняется биохимическими особенностями тканей земляники, в которых, помимо полисахаридов, содержится много антоцианов, катехинов (соединений фенольного происхождения), танинов (дубильных веществ) [4]. Эти соединения остаются в растворенном виде после обработки экстракта фенол-хлороформной смесью, не удаляются вместе с денатурированными белками и фенольной фазой, оставаясь в РНК-содержащей водной фазе. В процессе осаждения РНК спиртами (изопропиловым, этиловым и т.д.), хлоридом лития (разной молярности), ацетоном контаминанты преципитируют вместе с нуклеиновой кислотой и, попадая с ней в реакционные смеси, ингибируют проводимые в дальнейшем реакции. Методы выделения тотальной РНК с использованием сорбента SiO_2 или колонок фирмы QIAGEN также оказались неэффективными при работе с тканями земляники, т.к. полученный

осадок кроме РНК содержал большое количество контаминантов.

В результате сравнительного анализа методов пробоподготовки был отобран и после незначительной модификации успешно применялся метод Хомчинского. Лизис и депротеинизация клеток по этой методике проводятся в течение 10 мин при 60°C с использованием лизирующего раствора (содержащего мочевины, гуанидинтиоцианат, гуанидингидрохлорид, EDTA-Na, цитрат Na, тритон X-100, меркаптоэтанол), в равной пропорции смешанного с фенолом. Затем в пробирку с гомогенатом добавляли соосадитель (например, дрожжевую РНК) и хлороформ. После перемешивания на мешалке (вортексе) и охлаждения нуклеиновые кислоты фракционировались центрифугированием в течение 15 мин при 12000 об/мин. Процедуру первой преципитации РНК из водной фазы модифицировали с учетом того, что ткани анализируемых растений богаты полисахаридами и другими контаминантами, трудно отделимыми от РНК и ингибирующими обратную транскрипцию и саму полимеразную цепную реакцию. Полученную водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 1/2 объема изопропилового спирта и 1/2 объема раствора, содержащего 1,2 М NaCl и 0,8 М цитрата Na. После тщательного перемешивания центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин. Полученный осадок промывали 70% этиловым спиртом, переосаждали ацетоном и подсушивали при 60°C до полного испарения ацетона, после чего растворяли в 40-50 мкл бидистиллированной воды.

С целью выяснения, что именно биохимический состав тканей земляники осложняет выделение тотальной РНК, был проведен следующий наглядный эксперимент. К навеске

листьев картофеля, зараженного вирусом М, добавили фрагмент листа земляники и методом фенольной депротеинизации выделили препарат РНК. Получили вязкий, коричневый раствор тотальной РНК, даже визуально отличающийся от прозрачного препарата, параллельно выделенного исключительно из листьев инфицированного картофеля. Оба препарата использовали в качестве матрицы для проведения ОТ-ПЦР, разработанной для диагностики М вируса картофеля. Результаты реакции представлены на рис. 1. В отли-

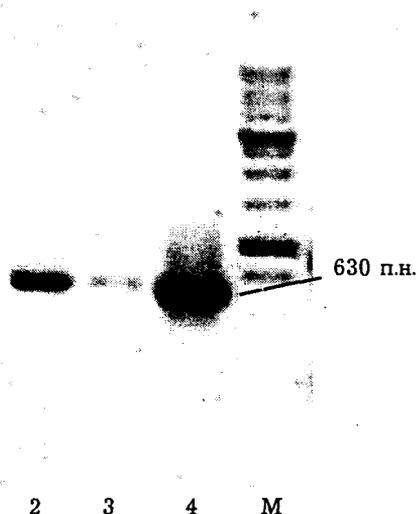


Рис. 1 Отработка метода выделения тотальной РНК из земляники для ОТ-ПЦР диагностики вирусных патогенов:

1 - РНК выделяли из смеси листьев картофеля, зараженного МВК, и листьев земляники методом фенольной депротеинизации; 2 - РНК выделяли из той же смеси по модифицированной методике Хомчинского, осадок после первой преципитации переносили в другую пробирку и выделенную РНК повторно переосаждали по той же методике; 3 - РНК выделяли из той же смеси по модифицированной методике Хомчинского, осадок после первой преципитации переносили в другую пробирку и выделенную РНК повторно переосаждали 8М LiCl; 4 - РНК выделяли из листьев картофеля, зараженного МВК (без листьев земляники); М (маркер)- Ladder 1 kb (фирмы Fermentas).

чие от исключительно хорошего продукта, амплифицированного в контрольном образце (трек 4), в опытном варианте наблюдалось полное ингибирование реакции (трек 1).

Представленная методика пробоподготовки по Хомчинскому была проверена в описанном выше эксперименте по выделению тотальной РНК из смеси тканей земляники и картофеля инфицированного М-вирусом картофеля. Результат реакции с РНК, полученной данным методом, представлен на треке 2 (рис. 1). Наличие четкого продукта соответствующего размера (630 п.н.) свидетельствует о целесообразности использования предложенной методики для выделения РНК из богатых контаминантами тканей, например, земляники.

На следующем этапе работы анализировалась возможность проведения реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) для диагностики вирусов земляники, относящихся к родам карла-, потеке- и неповирусы. К роду карлавирусы относится вирус ложного слабого пожелтения краев листьев земляники *strawberry pseudo mild yellow edge virus*, а к роду потексвирусы – вирус слабого пожелтения краев листьев *strawberry mild yellow edge virus*. Вирионы этих двух родов вирусов нитевидные, длиной около 800 нм и диаметром 13 нм, содержат одноцепочную (+) РНК, 3 – концевая область имеет полиадеенилированный остаток [14, 15]. Вирус ложного слабого пожелтения краев листьев земляники возможно диагностировать серологическими методами [16].

Вирус слабого пожелтения краев листьев вызывает на листьях земляники лесной, редко садовой, краевой хлороз, скручивание листовой пластинки по центральной жилке, укорачивание черешков. Вирус лож-

ного слабого пожелтения краев листьев земляники не вызывает заметных симптомов на видах *Fragaria* [13]. Латентность является характерной чертой вирусов карлагруппы.

В реакции обратной транскрипции для синтеза первой цепи кДНК на полученной тотальной РНК отжигались гексамерные олигонуклеотиды (праймеры), синтезированные фирмой Синтол (г. Москва). В 50 мкл реакционной смеси содержалось до 100 пмол этих праймеров, 1-2 мкл РНК, 0,5 мкмол смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 40 U РНК-зависимой ДНК-полимеразы (фермент предоставлен лабораторией молекулярной диагностики и геноинженерных конструкций ВНИИСБ) и 10 мкл пятикратного буфера. Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием вырожденных праймеров, разработанных в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ: Car F-46 (15,6 pmol/mkl) и Car R-52 (30,7 pmol/mkl) для выявления группы карлавирусов, Pot F 2A-50-69 (18,4 pmol/mkl) и Pot R 348-67 (16,2 pmol/mkl) для потексвирусов, Nepo-FIF (20,4 pmol/mkl) и Nepo-M2R (19,7 pmol/mkl) для определения неповирусов. В реакцию вносили до 10 пмол каждого праймера. Кроме того, в 25 мкл реакционной смеси содержалось 2 мкл кДНК, 0,25 мкмол смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 2,5 U ДНК-полимеразы (Taq-полимераза предоставлена лабораторией молекулярной диагностики и геноинженерных конструкций ВНИИСБ) и 10 мкл пятикратного буфера.

ПЦР проводили в автоматическом режиме на приборе «Терцик» фирмы «ДНК-Технологии». Оптимальные условия постановки реакции подбирали экспериментально. Результаты амплификации анализировали методом электрофореза в 1-2%

агарозном геле при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере, рН 8,0 и напряженности электрического поля 10 В/см в течение 20-40 мин. Гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл).

На наличие вирусов анализировали листья 2-3-летних растений земляники 8 сортов, выращенных на коллекционном участке Плодовой станции МСХА (по результатам индикаторного метода растения вирусинфицированы). В опытах при проведении ОТ-ПЦР в качестве положительных контролей использовали листья картофеля, зараженного М карлавирусом и Х потексвирусом картофеля; листья лебеды (*Chenopodium amaranticolor*), инфицированные неповирусами; листья растений земляники сортов Эстафета и Богота, зараженные (по результатам ИФА) вирусом, серологически родственным Х вирусу картофеля (ХВК), а также листья растений сорта Найдена, зараженные кольцевой пятнистостью малины.

При тестировании образцов земляники на зараженность карлавирусами пришлось экспериментально подбирать оптимальные температурные режимы для проведения полимеразной цепной реакции. Расчетный режим проведения ПЦР в програм-

ме «Саг1а-240»: денатурация 94°C — 1 мин; отжиг праймеров 45°C — 4 мин; элонгация 72°C — 3 мин, — оказался неподходящим. Проведена серия экспериментов по подбору оптимальных условий проведения ПЦР, в результате которой предложены следующие режимы проведения реакции: предварительная денатурация при 94° в течение 3 мин; 35 циклов, состоящих из денатурации при 94° в течение 1 мин; отжига праймеров при 50° в течение 4 мин и синтеза фланкируемого праймерами участка кДНК при 72° в течение 3 мин. Таким образом, только повышение температуры на 5°C на этапе отжига праймеров дало лучшие результаты. При этом на электрофореграмме была заметна четкая линия, находящаяся на уровне маркера размером 240 п.н., свидетельствующая о наличии в образце карлавирусов (рис.2). Был выявлен вирус, относящийся к роду карлавирусов, вероятно вирус ложного слабого пожелтения краев листьев strawberry pseudo mild yellow edge virus в образцах земляники сортов Брайтон и Дукат.

В результате серии экспериментов были определены условия постановки ПЦР для диагностики потексвирусов («Potex-1350»): 35 циклов,

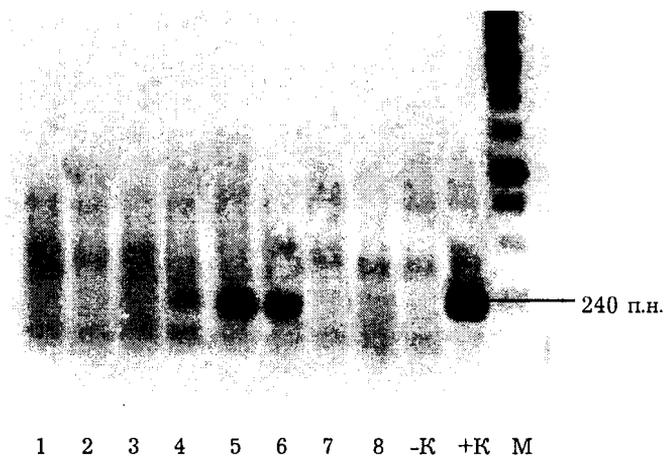


Рис. 2. ОТ-ПЦР-анализ различных сортообразцов земляники с использованием вырожденных праймеров для детекции группы карлавирусов:

1 — Редгонтлит №7, 2 — Надежда №1, 3 — Найдена №3, 4 — Троицкая №15, 5 — Брайтон №7, 6 — Дукат №11, 7 — Богота №8, 8 — Эстафета №6, -К — отрицательный контроль (здоровое растение), +К — положительный контроль (картофель, инфицированный МВК)

каждый из которых начинается денатурацией при 94° в течение 1 мин, затем следует отжиг праймеров при 54° в течение 2 мин и синтез фланкируемого праймерами участка кДНК при 72° в течение 3 мин. При тестировании образцов земляники на зараженность потексвирусами в опытных образцах мы увидели четкие зоны размером 1350 п.н., что соответствует расчетным данным (рис. 3). В образцах земляники сортов Богота и Эстафета, вегетировавших в открытом грунте, достоверно был выявлен патоген, относящийся к роду потексвирусов, вероятно вирус слабого пожелтения краев листьев земляники *strawberry mild yellow edge virus*.

К роду неповирусов, наиболее часто поражающих землянику, относятся вирус черной кольчатости томата *tomato black ring virus*, вирус кольцевой пятнистости малины *raspberry ring spot virus*, вирус мозаики резухи *arabis mosaic virus*. Вирионы этого рода вирусов изометрические, диаметром около 30 нм, содержат одноцепочную (+) РНК, передаются нематодами. Вызывают на землянике садовой различные симптомы в виде мозаики, хлорозов, деформаций, иногда некрозы и угнетение роста (2). Образцы земляники сорта Найдена, зараженные по

результатам ИФА, вирусом кольцевой пятнистости малины анализировали методом ПЦР.

Экспериментально нами были определены и условия постановки ПЦР для диагностики неповирусов (Nero-F1F и Nero-M2R). Удовлетворительным оказался следующий режим амплификации: предварительная денатурация при 94° в течение 2 мин; затем 30 циклов, каждый из которых начинается денатурацией при 94° в течение 1 мин, затем следует отжиг праймеров при 54° в течение 3 мин и синтез фланкируемого праймерами участка кДНК при 72° в течение 4 мин. Этот режим подходил для выявления неповирусов практически во всех анализируемых растительных образцах (лебеда, малины и земляники) и чистых препаратах. В результате на электрофореграмме (рис. 4, трек 6) были заметны расплывчатые зоны в области искомым пар нуклеотидов, выделенных из листьев земляники, хотя этот же вирус, выделенный из травянистого растения-индикатора лебеда *Chenopodium amaranticolor* с теми же праймерами и условиями проведения реакции дал четкие светящиеся зоны в области 350 пар нуклеотидов, характерных для этого вируса (рис. 4, трек 3).

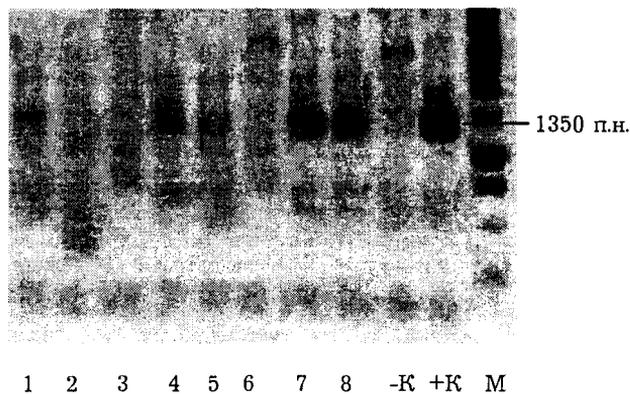


Рис. 3. ОТ-ПЦР-анализ различных сортообразцов земляники с использованием вырожденных праймеров для детекции группы потексвирусов:

1 — Редгонтлит №7, 2 — Надежда №1, 3 — Найдена №3, 4 — Троицкая №15, 5 — Брайтон №7, 6 — Дукал №11, 7 — Богота №8, 8 — Эстафета №6, -К — отрицательный контроль (здоровое растение), +К — положительный контроль (картофель, инфицированный ХВК).

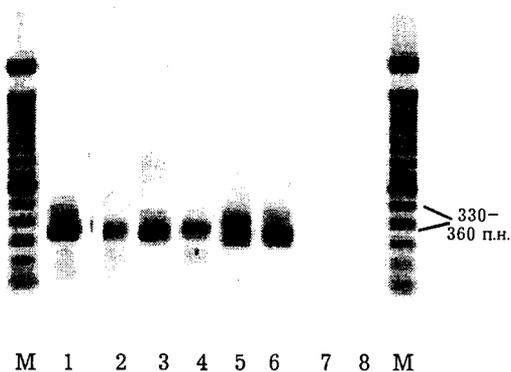


Рис. 4. ОТ-ПЦР анализ растений, инфицированных неповирусами:

1 - вирус мозаики резухи (ArMV) на *Chenopodium amaranticolor*, 2 - вирус короткоузлие виноградной лозы (GFLV) на *C. amaranticolor*, 3 - вирус кольцевой пятнистости малины (RRSV), 4 - вирус черной кольчатости томатов (TBRV) чистый препарат на *C. amaranticolor*, 5 - вирус кольцевой пятнистости табака (TRSV) чистый препарат, 6 - вирус кольцевой пятнистости малины (КИ5У) на землянике сорта Найдена, 7 - М вирус картофеля на картофеле (отрицательный контроль), 8 - вода (контроль ОТ-ПЦР), М - маркер 100-bp Ladder.

Все сортообразцы земляники, представленные для выявления в них карлавирусов и потексвирусов методом ПЦР были параллельно протестированы прививкой на индикаторных клонах земляники лесной. Результаты сравнения достоверности результатов тестирования двумя методами представлены в таблице.

Сравнение достоверности диагностики вирусов земляники методом ПЦР и индикаторным (2002 г.)

Сортообразец	ПЦР		Индикаторный
	карла-вирусы	потекс-вирусы	
Редгонтлит №7	-	+-	++
Надежда №1	-	-	+
Найдена №3	-	-	+
Троицкая №15	+-	+-	+
Брайтон № 7	++	+-	+
Дукат №11	++	-	+-
Богота №8	-	++	++
Эстафета №6	-	++	+

Примечание: ++ достоверное наличие вирусов, + - недостоверное наличие вирусов, - отсутствие вирусов.

Метод прививки на индикаторных растениях позволил выявить большее количество образцов, зараженных вирусной инфекцией, метод ПЦР — только те вирусы, к которым были синтезированы праймеры. По-видимому, ПЦР является более

чувствительным методом. Например, в образце Дукат № 11 индикаторным методом наличие вирусов ставится под сомнение, хотя ПЦР-анализ достоверно показал в нем наличие карлавирусов. Это еще можно объяснить и тем, что вирусы данного рода, в частности, вирус ложного слабого пожелтения краев листьев земляники, не вызывают симптомов на видах *Fragaria*, в нашем случае используемых как индикаторы.

Наибольшие трудности при изучении возможности диагностики вирусов земляники возникали на этапе пробоподготовки образцов земляники при выделении общей РНК. На этапах обратной транскрипции и амплификации для каждого рода вирусов при использовании конкретных реактивов и праймеров требуется оптимизировать режимы температуры.

Несмотря на это, мы считаем, что ПЦР-метод является перспективным, поскольку позволяет выявлять вирусы всех родов, и после доработки технологии его применения станет основным методом тестирования при производстве оздоровленного посадочного материала земляники.

Выводы

1. Для выделения тотальной РНК из листьев земляники наиболее подходит метод П. Хомчинского.

2. Оптимальными условиями проведения ПЦР для диагностики вирусов земляники рода карлавирусов являются следующие: предварительная денатурация при 94° в течение 3 мин; 35 циклов, состоящих из денатурации при 94° в течение 1 мин; отжига праймеров при 50° в течение 4 мин и синтеза фланкируемого праймерами участка кДНК при 72° в течение 3 мин.

3. Определены подходящие условия постановки ПЦР для диагностики потексвирусов («Potex-1350»): 35 циклов, каждый из которых начинается денатурацией при 94° в течение 1 мин, затем следует отжиг праймеров при 54° в течение 2 мин и синтез фланкируемого праймерами участка кДНК при 72° в течение 3 мин.

4. Для диагностики неповирусов удовлетворительным оказался следующий режим амплификации: предварительная денатурация при 94° в течение 2 мин; затем 30 циклов, каждый из которых начинается денатурацией при 94° в течение 1 мин, затем следует отжиг праймеров при 54° в течение 3 мин и синтез фланкируемого праймерами участка кДНК при 72° в течение 4 мин.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. С.К. Завриеву за профессиональное обсуждение результатов, а также к.б.н. О.Л. Ворониной за методическую помощь при выделении РНК.

1. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. М.: Мир, 1978. — 2. Келдыш М.А. Методические указания по оценке устойчивости плодовых и ягодных культур к вирусным и микоплазменным заболеваниям. М.: НИЗИСНП, 1979. — 3. Соколова С.М. Диагностика вирусных заболеваний земляники. 1988, № 11, с. 40-42. — 4. Warden F.C., Kleczkowski A. — J. Pomol., 1945, vol. 21, № 1, p. 2-7. — 5. Chomczynski P. — BioTechniques, 1993, vol. 15, p. 532-537. — 6. Chomczynski P., Mackey K. — BioTechniques, 1995, vol. 19, № 6, p. 942-945. — 7. Converse R.H., Adams A.N. et al. — Plant Dis., 1988, vol. 72, № 9, p. 744-749. — 8. Hadidi A., Montasser M.S. et al. — Plant Dis, 1993, vol. 77, № 6, p. 595-601. — 9. Henson J. M., French R. — Ann. Rev. of Phytopathology, 1993, vol. 31, p. 81-109. — 10. Janse J.D. — Bui. OEPN, 1995, p. 25, № 1-2, p. 5-17. — 11. Jelkman W., Lessemann D.E., Casper R. — J. Phytopathology, 1988, vol. 121, № 2, p. 143-149. — 12. Stenger D.C., Mullin R.H., Morris T.J. — Phytopathology. 1988, vol. 72, № 2, p. 154-159. — 13. Wu Yuanhua, Wei Shiquan. — Acta phytopathol. sinica, 1995, vol. 25, № 4, p. 367-372. — 14. Yoshikawa N., Inouye T. — Ann. Phytopatol. Soc. Jpn, 1986, vol. 52, p. 643-652. — 15. Yoshikawa N., Ohki S., Kobatake H. et al. — Ann. Phytopatol. Soc. Jpn, 1984, vol. 52, p. 658-663. — 16. Yoshikawa N., Poolpol P., Inouye T. — Ann. Phytopatol. Soc. Jpn, 1986, vol. 52, p. 728-731.

*Статья поступила
16 февраля 2004 г.*

SUMMARY

Results of investigation according to diagnosis of phytoviruses carlapotex and nepoviruses stems conducted in strawberry plants by method of polymerase chain reaction (PCR) are presented. Method of secreting total ribonucleic acid from strawberry tissues is worked off. Regimes of amplification are experimentally selected. Results of comparing trustworthiness of testing strawberry viruses by two methods-PCR and indicator method — have been analysed.