

ТРУДНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА МОЗАИКИ КОСТРА

Звягинцева Дарья Дмитриевна, аспирант кафедры защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

E-mail: dzvyaginseva@gmail.com

Белошапкина Ольга Олеговна, д.с.-х.н., профессор кафедры защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

E-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru

Лопаткин Антон Александрович, к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярно-генетических методов диагностики, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

E-mail: lopatkin86@mail.ru

Аннотация: *в настоящее время существует проблема выявления и идентификации вирусов злаковых зерновых культур, в частности – вируса мозаики костра (Brometosaicivirus, BMV). В ходе данной работы были проведены маршрутные обследования полей в Ростовской области и отбор образцов для дальнейших лабораторных исследований. В результате ОТ-ПЦР был получен положительный результат, однако подтвердить наличие вируса мозаики костра в исследуемых растениях не удалось.*

Ключевые слова: *пшеница, вирус мозаики костра, распространение, идентификация, ПЦР.*

Введение. Вирусы злаковых зерновых культур являются одной из наиболее трудноискореняемых и вредоносных групп патогенов. Вирусы могут вызывать потери урожая до 90%, в зависимости от фазы, в которую произошло заражение [5]. На сегодняшний день известно о распространении вирусов злаковых зерновых культур в ряде стран Европы, Ближнего Востока, Африки и в Северной Америке [4]. Ежегодно появляются сообщения о выявлении вирузов зерновых в новом регионе.

Сложность оценки распространения вирусов злаковых зерновых обусловлена трудностями их диагностики. Видимые симптомы, такие как мозаичность, хлоротичность, крапчатость листьев, а также общее угнетение роста, схожи с симптомами других как инфекционных, так и неинфекционных заболеваний злаковых зерновых [2]. Более надежными являются инструментальные методы диагностики, такие как серологический (ИФА) и молекулярный (ОТ-ПЦР).

Этими методами в ряде стран поводят массовое тестирование, например, таких вирусов зерновых как вирус мозаики костра (*Bromemosaicvirus*, BMV), вирус желтой карликовости ячменя (*Barleyyellowdwarfvirus*, BYDV), почвообитающий вирус мозаики пшеницы (*Soil-borne wheat mosaic virus*, SBWMV) и многих других [3].

Хотя метод классической ОТ-ПЦР обладает высокой достоверностью и чувствительностью, при использовании его для диагностики ряда вирусов могут возникнуть трудности, описанию которых и посвящена данная работа.

В качестве объекта данного исследования был выбран вирус мозаики костра (*Bromemosaicvirus*, BMV), род *Bromovirus*, семейство *Bromoviridae*. Он поражает около 160 растений из семи разных семейств, включая 50 видов злаковых зерновых – ячмень, пшеницу, рожь, тритикале, овёс, кукурузу и другие [6]. Потери урожая, вызванные BMV, могут достигать 60%, при этом снижается качество зерна [1].

Материалы и методы. Визуальные обследования посевов и отбор смешанных сортообразцов озимой пшеницы в фазе кущения были проведены в хозяйствах Ростовской области (20 га) в 2020 году. Маршрутные обследования полей в каждом регионе проводили в весенний период, визуально оценивая распространённость вирусоподобных симптомов в 10-20 точках по 10 растений, расположенных рандомизированно.

Лабораторные исследования проводили в ФГБУ ВНИИКР. Для исследования были выбраны растения (11-15 шт), имеющие вирусоподобные симптомы, такие как хлоротичность и мозаичность листьев.

Тотальная РНК из фрагментов листьев была выделена при помощи набора «Проба НК» фирмы «Агродиагностика», согласно инструкции производителя. ОТ-ПЦР (обратную транскрипцию – полимеразно-цепную реакцию) проводили в один этап, используя набор «ПЦР-микс» фирмы «Синтол». Состав реакционной смеси: 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, 0,75 мг/мл $MgCl_2$ (25мМ), 0,4 мкл MMLV-ревертазы (50 ед/мкл), по 1 мкл прямого и обратного праймера, 1 мкл РНК и вода до 25 мкл.

Нами были использованы следующие праймеры [7]:

BMVcp-F GATCTATGTCCTAATTCAGCG

BMVcp-R CCAGTCAGGGGCTCTCCGAGC

Ранее они были отработаны на изоляте BMVPV-0194 DSMZ. Эти праймеры комплементарны участку молекулы РНК-3.

Размер продукта – 626 п.н. Амплификацию проводили в следующем режиме: 45⁰С в течение 15 минут, 94⁰С 5 минут, далее 35 циклов, включающих денатурацию при 94⁰С в течение 30 с, отжиг праймера при 55⁰С - 30 с и элонгацию при 72⁰С – 60 секунд. Финальная элонгация проходила при 72⁰С в течение 5 минут. Визуализацию результатов ОТ-ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Далее было проведено секвенирование продуктов амплификации.

Результаты и обсуждение. На рисунке 1 показаны результаты электрофореза продуктов амплификации кДНК, полученной из нескольких сортообразцов пшеницы, в агарозном геле.

Из рисунка 1 видно, что образец 9, образцы с 1* по 4*, а также образец 7* не содержат вируса мозаики костра, несмотря на наличие вирусоподобных симптомов на зеленых частях растений.

Образцы 5* и 6* содержали РНК вируса мозаики костра с большой долей вероятности. Об этом можно судить по расположению зоны свечения, соответствующей размеру специфического продукта реакции амплификации.

Для подтверждения была предпринята попытка секвенирования ампликонов, однако прочесть последовательность не удалось.

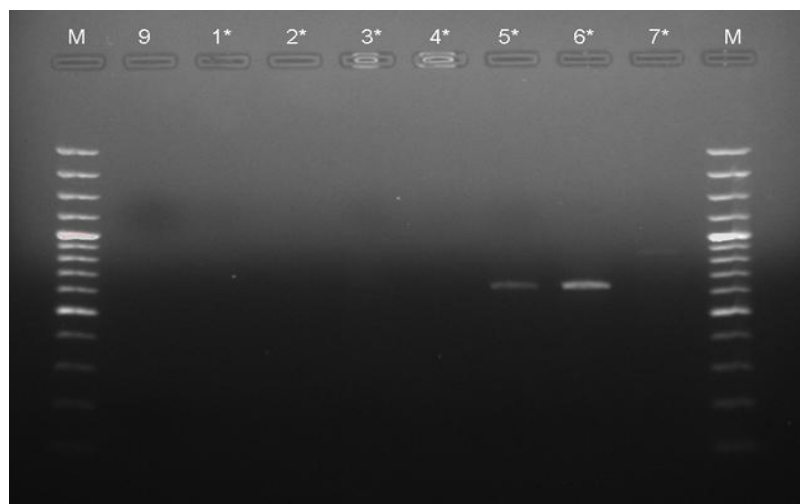


Рисунок 1 – Электрофорез продуктов амплификации кДНК в агарозном геле. Размер продукта - 626 п.н.

Тогда была проведена повторная амплификация кДНК из образцов 5* и 6* в аналогичных условиях. Её результаты, визуализированные также методом электрофореза в агарозном геле, представлены на рисунке 2. Здесь под номером 1 – образец 5*, под номером 2 – образец 6*. На данной электрофореграмме видно, что, помимо целевого продукта размером 626 п.н., в результате амплификации были получены побочные продукты, как более крупные, так и более мелкие. Результаты секвенирования этих ампликонов также не удалось прочесть. Предположительно, невозможность прочесть последовательность связана именно с наличием побочных продуктов амплификации.

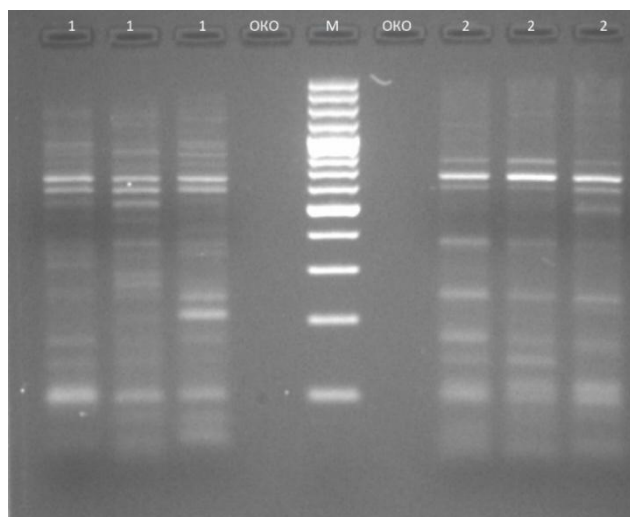


Рисунок 2 – Электрофорез продуктов амплификации кДНК в агарозном геле. Размер продукта - 626 п.н.

Заключение. На сегодняшний день наиболее быстрым и надежным методом выявления и идентификации вирусов злаковых зерновых культур является ОТ-ПЦР. Однако при её использовании могут возникать определённые сложности. В нашей работе наличие побочных продуктов амплификации при выявлении вируса мозаики ковра сделало невозможным секвенирование ампликонов. Мы не можем быть уверены в том, что полученный результат ОТ-ПЦР не является ложноположительным. Очевидно, что лабораторный метод диагностики BMV требует доработки. Требуется повторное обследование изучаемого агроценоза пшеницы и оптимизация условий проведения амплификации по температурному режиму и составу реакционной смеси. В силу этих причин для достоверной диагностики часто приходится использовать одновременно два метода или модификации, особенно в случае карантинных вирусов.

Библиографический список

1. Богоутдинов, Д.З. Вирусные заболевания зерновых культур в Самарской области / Д.З. Богоутдинов, Т.Б. Кастальева, Н.В. Гирсова // Вестник Оренбургского Государственного Университета. 2017. № 4(204). С. 46-52.
2. Глинушкин, А.П. Диагностика вирусных симптомов у сортообразцов озимой пшеницы из коллекции ВНИИР / А.П. Глинушкин [и др.] // Достижения науки и техники АПК. 2013. №2. С. 24-26.
3. Глинушкин, А.П. Практические аспекты вирусологического обследования озимой пшеницы на Южном Урале / А.П. Глинушкин, А.А. Райов, О.О. Белошапкина // Аграрный вестник Урала. 2013. № 7 (113). С. 4-8.
4. Звягинцева, Д.Д. Распространённость почвообитающих вирусов зерновых культур в странах ЕОКЗР / Д.Д. Звягинцева, О.О. Белошапкина // Материалы Международного молодежного научного

форума «Ломоносов – 2020» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2020/index.htm

5. Звягинцева, Д.Д. Мониторинг и меры защиты от почвообитающих вирусов пшеницы и ячменя / Д.Д. Звягинцева, О.О. Белошапкина // Материалы международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 160-летию В.А. Михельсона. 2020. С. 23-25.
6. Маркелова, Т.С. Мониторинг вирусных болезней и борьба с ними / Т.С. Маркелова, Э.А. Баукенова // Защита и карантин растений. 2015. №2. С. 29-31.
7. Trzmiel, K. Identification of new Brome mosaic virus (BMV) isolates systemically infecting *Vigna unguiculata* L / K. Tzimel [et al.] // European Journal of Plant Pathology. 2016. Vol. 145. P. 233-238.

Difficulties of laboratory diagnostics of brome mosaic virus

Zvyagintseva D.D., Postgraduate student

Beloshapkina O.O., D.Sc. in Agricultural Sciences

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy

127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 49

Lopatkin A.A., PhD in Biology

All-Russian Center for Plant Quarantine

140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye district, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str., 32

Abstract: *Currently, there is a problem of detecting and identifying viruses in cereal crops, in particular, the Brome mosaic virus (BMV). In the course of this work, route surveys of fields in the Rostov region were carried out and samples were taken for further laboratory studies. As a result of RT-PCR, a positive result was obtained, however, it was not possible to confirm the presence of the Brome mosaic virus in the studied plants.*

Key words: *wheat, brome mosaic virus, prevalence, identification, PCR.*