

УДК 632.937.15

DOI 10.30679/2587-9847-2024-38-50-55

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСОВ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Песнев В.Б., Федорович С.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» (Краснодар)

Реферат. В данной статье рассматриваются методы идентификации вирусов земляники садовой (*Fragaria × ananassa Duchesne*). Исследование включает оптимизацию методов выделения РНК при помощи буферов СТАВ, а также проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации вирусов. Результаты показывают, что метод с использованием буфера СТАВ2 наиболее эффективен для выделения чистой РНК вирусных патогенов в достаточном для их идентификации количестве. Наибольшее количество образцов было заражено двумя патогенами, а именно вирусом морщинистости земляники и вирусом мозаики резухи, существенно влияющими на урожайность.

Ключевые слова: вирусы земляники, РНК, СТАВ, ПЦР, вирус мозаики резухи, вирус морщинистости земляники.

Summary. This article discusses methods for identifying viruses in strawberry (*Fragaria × ananassa Duchesne*). The research includes optimizing methods for RNA extraction using СТАВ buffers, as well as polymerase chain reaction (PCR) to identify viruses. The results show that the method using СТАВ2 buffer is most effective for isolating pure RNA from viral pathogens in sufficient quantities for their identification. The largest number of samples were infected with two pathogens, namely the strawberry wrinkle virus and the rhizome mosaic virus, which significantly affect yield.

Key words: strawberry viruses, RNA, СТАВ, PCR, strawberry crinkle virus, arabis mosaic virus.

Введение. Земляника садовая (*Fragaria ananassa Duchesne*) является одной из наиболее значимых культур, выращиваемых в мировом масштабе. Из-за высокой экономической значимости данной культуры существует необходимость в эффективной идентификации вирусных заболеваний, способных значительно снизить ее урожайность [1, 2].

Для большинства вирусов земляники, а именно вируса мозаики резухи (ArMV), вируса морщинистости земляники (SCV), вируса черной окольцованности томата (TBRV), вируса крапчатости земляники (SMoV), вируса кольцевой пятнистости малины (RpRSV), на данный момент времени нет стандартных протоколов идентификации [3, 4].

На данный момент достоверно известно о двадцать одном виде вирусов, входящих в состав комплексной инфекции земляники садовой. Классификация вирусов опирается на систему Балтимора, которая описывает тип генома и способ репликации вирусов. Из двадцати одного вида вирусов земляники: семнадцать видов относятся к четвертой группе

по Балтимору, три вида к пятой группе и один вид к седьмой. Соответственно, геномы большинства исследуемых вирусов представлены одноцепочечной РНК(+), меньшая часть одноцепочечной РНК(-) и ДНК с промежуточной стадией в виде РНК [5, 6].

Вирусы морщинистости земляники и мозаики резухи считаются наиболее опасными для земляники садовой, так как потери урожая, в следствие заражения, могут достигать 70 % [7]. Часто наблюдается межродовое заражение вирусами, например, вирусом мозаики резухи и черной пятнистости томата, вирусом мозаики малины [8, 9].

Среди методов идентификации вирусов земляники, наиболее эффективными считаются методы серологического и молекулярно-генетического анализа. Метод ПЦР с обратной транскрипцией и детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), наиболее часто встречающийся метод идентификации вирусов растений [10]. Данный метод обладает рядом преимуществ, среди которых высокая чувствительность и воспроизводимость [11].

Основной целью являлись оценка и оптимизация методов выделения РНК и метода ПЦР для идентификации некоторых вирусов земляники.

Объекты и методы исследований. Исследование было проведено в 2022-2023 гг. в лаборатории вирусологии ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», с использованием технологического оборудования ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия».

Объектами исследования являлись: вирус мозаики резухи (ArMV), вирус морщинистости земляники (SCV), вирус черной окольцованности томата (TBRV), вирус крапчатости земляники (SMoV), вирус кольцевой пятнистости малины (RpRSV), а также сорта земляники садовой (*Fragaria × ananassa Duchesne*): Магнус, Моллинг Опал, Клери.

Для выделения РНК из растений был использован контрольный метод, предложенный Yu D. et al. (СТАВ 1) и две его модификации (СТАВ 2, СТАВ 3) [12].

Состав буфера СТАВ 1: 3 % СТАВ, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2.5 % PVP, 1 % β-меркаптоэтанол; Буфер СТАВ 2 отличался от контрольного 2 % СТАВ, 2M хлорид натрия, 25mM EDTA, 2 % β-меркаптоэтанолом, а буфер СТАВ 3- 20 mM EDTA, 1.4M NaCl, 5 %PVP .

Для буфера СТАВ2 и СТАВ3 использовались дополнительные шаги осаждения и центрифугирования.

Анализ концентрации, показателей оптической чистоты по отношениям A260/280 нм и A260/230 нм выделенной РНК проводился на спектрофотометре Nano-500 (Allsheng, Китай).

Идентификация исследуемых вирусов земляники проводилась при помощи метода ПЦР, в частности ОТ-ПЦР-РВ, на приборе QuantStudio 5 (ThermoFisherScientific, США). Первичная денатурация проводилась при температуре 95 °С в течение 5 минут, денатурация 95 °С 15 сек, отжиг при температуре 58 - 63 °С в течение 30 сек, элонгация при температуре 72 °С в течение 45 сек. Финальная элонгация 72 °С 10 мин.

Состав реакционной смеси объемом 25 мкл включал следующие компоненты: 5X OneTube PCRmix SYBR 6 мкл, по 1 мкл 4 пкМ каждого праймера, 50-100 нг ДНК матрицы, деионизованная H₂O до 25 мкл.

Протокол выделения:

<p>1. Гомогенизация: Замороженные листья (0,1 г) гомогенизируют в ступке с жидким азотом и поливинилпирролидоном (PVP);</p> <p>2. Экстракция: Полученный порошок помещают в стерильную центрифужную пробирку с 700 мкл предварительно нагретого экстракционного буфера, энергично встряхивают в течение 1 минуты и инкубируют при 65 °С в течение 10 минут;</p> <p>3. Центрифугирование: Центрифугируют при 15 700 g в течение 5 минут. Супернатант переносится в новую стерильную пробирку;</p> <p>4. Хлороформная экстракция: Добавляют равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта, энергично встряхивают 1 минуту и центрифугируют при 15 700 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Супернатант переносится в новую пробирку;</p>	<p>5. Повторная экстракция: После добавления равного объема хлороформа пробирку встряхивают 1 минуту и центрифугируют при 15 700 g в течение 10 минут при комнатной температуре;</p> <p>6. Хлорид лития: Верхнюю фазу переносят в новую пробирку и добавляют равный объем хлорида лития;</p> <p>7. Осаждение: Инкубируют при 4 °С в течение 4 часов, затем центрифугируют (15 700 g, 15 минут, 4 °С). Осадок промывают 75% этанолом;</p> <p>8. Сушка и ресуспендирование: Центрифугируют при 5 900 g в течение 5 минут, осадок сушат на воздухе и ресуспендируют в 30 мкл воды или SS-TE/SE-TE.</p>
---	---

Статистический анализ проводился при помощи следующих методов: дисперсионного анализа ANOVA, теста Шеффе.

Обсуждение результатов. Полученные в результате выделения препараты тотальной РНК методами СТАВ 1, СТАВ 2 И СТАВ 3 имели среднюю концентрацию - 55 нг/мкл.

Методы СТАВ 1 и СТАВ 2 не показали различий в концентрации выделенной РНК (рис. 1), что свидетельствует о том, что внесенные изменения позволили повысить чистоту, но не повлияли на концентрацию выделенной РНК. Наименьшая концентрация препаратов тотальной РНК была получена при выделении модификацией СТАВ 3 и составила, в среднем, - 22 нг/мкл.

Концентрация РНК, выделенной при помощи метода с использованием буфера СТАВ1, составила в среднем $66,91 \pm 18,98$ нг/мкл. Концентрация РНК, выделенной при помощи метода с использованием буфера СТАВ 2, составила в среднем $78,37 \pm 34,50$ нг/мкл. Среднее значение оптической плотности по отношению A_{260}/A_{280} нм при выделении РНК с буфером СТАВ 1 равно $1,74 \pm 0,19$. Для метода с использованием буфера СТАВ 2 среднее отношение A_{260}/A_{280} нм - $2,03 \pm 0,11$. Для метода СТАВ 3 среднее значение A_{260}/A_{280} нм было равно $1,51 \pm 0,18$.

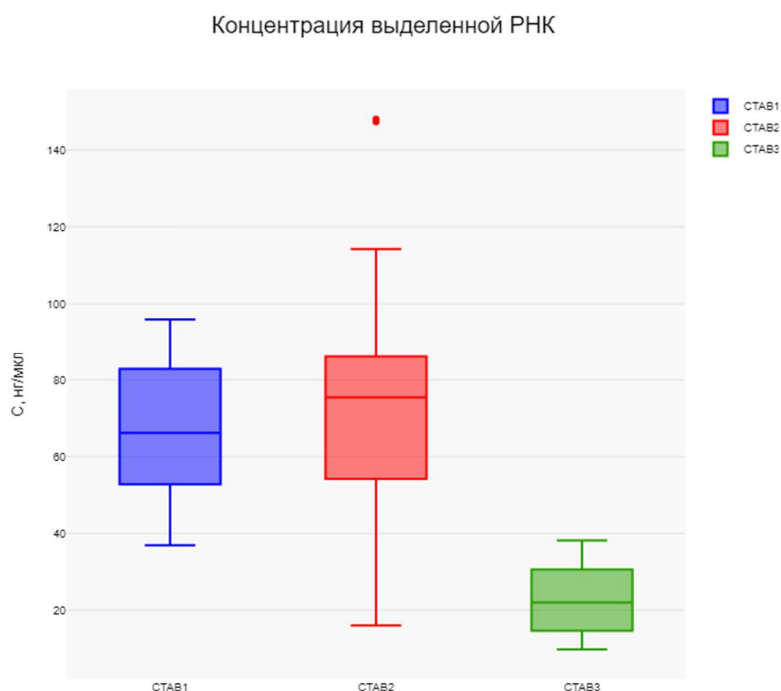


Рисунок 1 – Концентрация препаратов total РНК с применением различных буферов на основе СТАВ

Для оптической плотности A260/230 нм значительные различия были между методом СТАВ 2 и СТАВ 3 (рис. 2 А). Среднее значение оптической плотности A260/230 нм при выделении РНК буфером СТАВ 1 равно $1,74 \pm 0,19$. Для метода с использованием буфера СТАВ 2 среднее отношение A260/280 нм - $2,03 \pm 0,11$. Для метода СТАВ 3 среднее значение оптической плотности A260/280 нм было равно $1,51 \pm 0,18$.

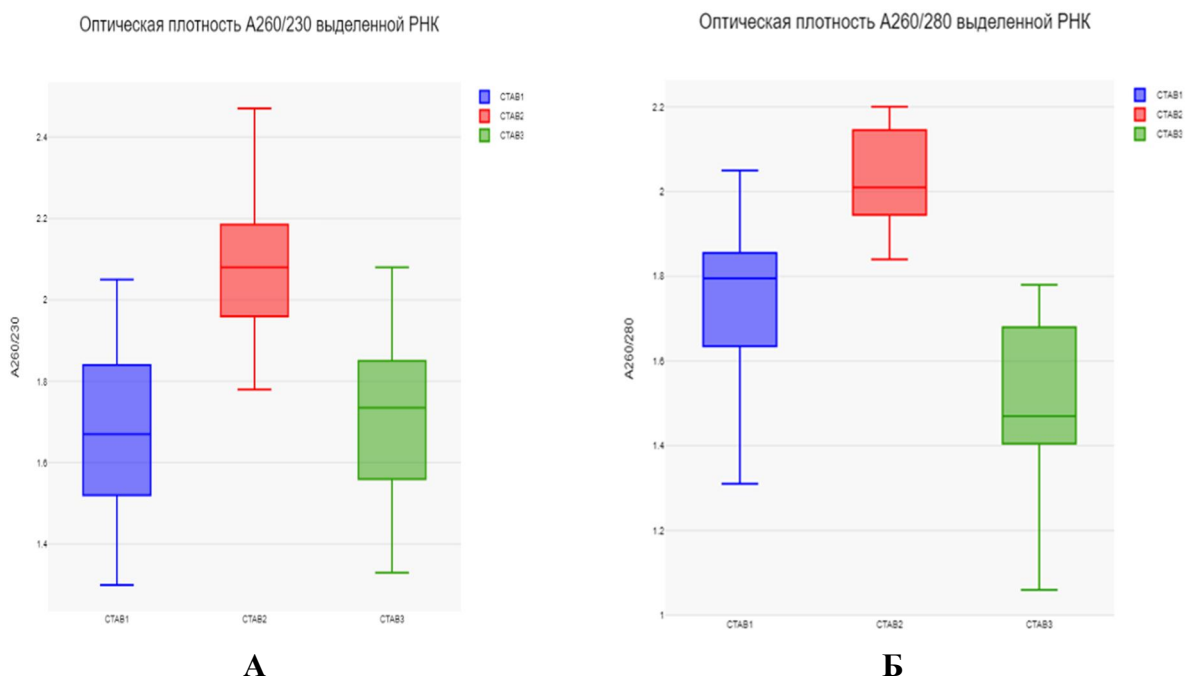


Рисунок 2 – А. Отношение оптической плотности A260/230 нм препаратов total РНК; Б. Отношение оптической плотности A260/280 нм препаратов total РНК

Далее был применен тест Шеффе к каждой из трех пар методов, для определения статистически значимой разницы.

Таблица 1 – Результаты теста Шеффе для трех пар методов СТАВ

A260/280			A260/230			Концентрация, нг/мкл		
Пары методов	Шеффе Т-критерий	Шеффе р-уровень	Пары методов	Шеффе Т-критерий	Шеффе р-уровень	Пары методов	Шеффе Т-критерий	Шеффе р-уровень
СТАВ1/СТАВ2	5.5350	4.7421e-06	СТАВ1/СТАВ2	6.9604	2.4318e-08	СТАВ1/СТАВ2	1.2797	0.2058216
СТАВ1/СТАВ3	4.1257	0.0005830	СТАВ1/СТАВ3	0.6507	0.8098178	СТАВ1/СТАВ3	5.9486	3.4914e-07
СТАВ2/СТАВ3	9.6607	9.9232e-13	СТАВ2/СТАВ3	6.3097	2.7763e-07	СТАВ2/СТАВ3	7.2284	3.9738e-09

Значение р, соответствующее F-статистике однофакторного дисперсионного анализа ниже 0,01, что свидетельствует о том, что анализируемые методы имели статистически значимые различия. Статистическая обработка данных оптической плотности A260/280 нм показала статистически достоверное различие между результатами трех методов. По данным оптической плотности A260/230 нм пара методов СТАВ 1/СТАВ 3 не показала различий.

По данным ПЦР анализа в исследуемых образцах были определены целевые фрагменты генов исследуемых вирусов. Амплификация данных фрагментов была стабильной (рис. 3)

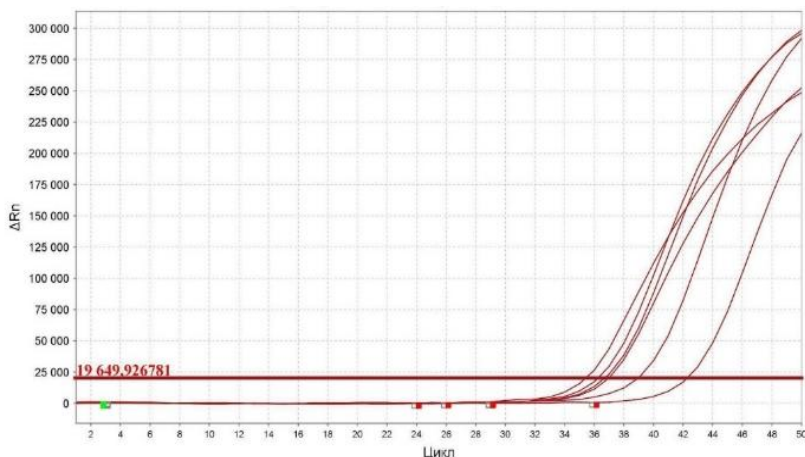


Рисунок 3 – График амплификации вируса мозаики резухи и вируса морщинистости земляники

Соответственно матрица РНК, полученная методом СТАВ 2 была пригодна для проведения ПЦР анализа при идентификации исследуемых вирусов. Вирус мозаики резухи показал быстрый рост экспоненциальной кривой после 34 цикла, тогда как рост кривой амплификации вируса морщинистости земляники наблюдался после 36 цикла.

Вирус морщинистости земляники, вирус мозаики резухи были обнаружены во всех исследованных образцах трех сортов. Вирус черной окольцованности томата был обнаружен в четырех образцах Моллинг Опал, вирус крапчатости земляники в четырех образцах Клери, вирус пятнистости малины в двух образцах Магнуса, вирус мозаичности земляники и вирус мозаики резухи были обнаружены во всех образцах.

Выводы. В результате исследования был оптимизирован метод выделения РНК на основе буфера СТАВ. Существенными модификациями, влияющими на результаты выделения, были: дополнительные шаги осаждения образцов РНК, меньший объем используемого хлороформа, а также концентрация СТАВ – 2%. Наилучший результат при выделении тотальной РНК из тканей земляники показал метод с использованием буфера СТАВ 2, средняя концентрация тотальной РНК $78,37 \pm 34,50$ нг/мкл. По итогам исследования были обнаружены следующие вирусы: вирус мозаики резухи (ArMV), вирус морщинистости земляники (SCV), вирус черной окольцованности томата (TBRV), вирус крапчатости земляники (SMoV), вирус кольцевой пятнистости малины (RpRSV).

Литература

1. Martin R. R., Tzanetakis I. E. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses //Plant disease. 2006. Т. 90. №. 4. С. 384-396.
2. Говорова Г. Ф., Говоров Д. Н. “Земляника и клубника. Монография”. Проспект, 2015.
3. Martin R. R., Tzanetakis I. E. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses //Plant disease. 2006. Т. 90. №. 4. С. 384-396.
4. Tzanetakis I. E., Martin R. R. Expanding field of strawberry viruses which are important in North America //International Journal of Fruit Science. 2013. Т. 13. №. 1-2. С. 184-195.
5. Упадышев М. Т. и др. Закономерности распространения вредоносных вирусов в агроценозах малины и земляники садовой //Плодоводство и ягодоводство России. 2015. Т. 41. С. 366-370.
6. Метлицкая К. В. Вирусные болезни земляники и их диагностика в РФ //Плодоводство и ягодоводство России. 2009. Т. 22. №. 2. С. 136-141.
7. Упадышев М. Т., Метлицкая К. В., Петрова А. Д. Мониторинг вирусов в насаждениях ягодных культур в условиях Московской области //Селекция и сорторазведение садовых культур. 2017. Т. 4. №. 1-2. С. 142-144.
8. Babini A. R. et al. Occurrence and identification of strawberry viruses in five European countries //X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases 656. 2003. С. 39-43.
9. Koloniuk I. et al. Identification and characterization of a novel umbra-like virus, strawberry virus A, infecting strawberry plants //Plants. 2022. Т. 11. №. 5. С. 643.
10. Valentova L. et al. Symptomless infection by strawberry virus 1 (StrV-1) leads to losses in strawberry yields //Plant Pathology. 2022. Т. 71. №. 5. С. 1220-1228.
11. Marti E., Ferrary-Américo M., Barardi C. R. M. Detection of potential infectious enteric viruses in fresh produce by (RT)-qPCR preceded by nuclease treatment //Food and environmental virology. 2017. Т. 9. С. 444-452.
12. Yu D. et al. Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (*Fragaria × ananassa*) //Journal of Agricultural Science. 2012. Т. 4. №. 7. С. 51.