

МОДИФІКАЦІЯ МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ДВОЛАНЦЮГОВИХ РНК ВІРУСІВ З ПЛОДОВИХ ТІЛ ПЕЧЕРИЦІ ДВОСПОРОВОЇ

Встановлено наявність вірусної інфекції у результаті аналізу длРНК, виділеної з плодових тіл печериці двоспорової. Присутність фрагментів длРНК вірусного походження збігається з результатами досліджень, викладеними в роботах [Grogan, 2002; Adie, Gaze, 2003; Maffettone, Mills, 2007] щодо можливості ураження грибів специфічними міковірусами. Проведені дослідження дають підстави твердити про ефективність запропонованої методики ідентифікації длРНК, що виділені із плодових тіл печериці двоспорової.

Ключові слова: печериця двоспорова, вірусна хвороба, ідентифікація, длРНК, діагностика.

Постановка проблеми

Створення та розвиток нової для України галузі сільськогосподарського виробництва – грибівництва є одним із важливих напрямів розв’язання проблеми збагачення раціонів населення повноцінними продуктами харчування та покращення стану навколишнього середовища за рахунок утилізації відходів сільського господарства і переробної промисловості. Першочерговою передумовою одержання високих та сталих врожаїв їстівних грибів, зокрема й печериці двоспорової, на частку якої припадає 35–45 % від загального обсягу виробництва грибів [2], є отримання і впровадження у виробництво високоякісного посівного матеріалу з високою стійкістю до хвороб та вільного від патогенів, зокрема вірусної природи [2, 4, 7, 9]. Останніми роками вірусні хвороби стали одними із найшкодочинних для грибних культур і призводять до зниження врожайності та якості продукції [4–6, 9]. Зокрема, для культури *Agaricus bisporus* описано понад десять патогенних вірусів. Оскільки наразі в

Україні відсутні високоточні і високоефективні молекулярні діагностикуми для детекції та ідентифікації міковірусів, необхідним є створення високочутливих тест-систем на основі ПЛР-ідентифікації шляхом вивчення фізико-хімічних і молекулярно-біологічних властивостей міковірусів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Впродовж останніх 20 років у літературі з'явилися роботи, присвячені вивченню вірусних захворювань печериці і заходів боротьби з ними [1–3, 7]. Найнебезпечнішим серед них є захворювання La France (LFIV або LIV), яке у плодових тілах індукується віріоном розміром 35 нм. Цей ізометричний вірус був предметом широких епідеміологічних досліджень і боротьби, тому наразі захворювання La France зустрічається досить рідко [2, 8, 9]. В останні роки вірусні хвороби стали дуже поширеними при промисловому виробництві грибів. Англійські вчені наприкінці 90-х років XX століття повідомили про зниження врожаю грибів, причини якого не змогли встановити. Симптоми захворювання були відсутні, але грибниці були практично без ознак росту плодових тіл. Число постраждалих господарств із подібною етіологією збільшилося. Кілька симптомів відповідали захворюванню на La France, однак діагностичні тести для сферичного вірусу показували негативні результати. Останнім часом цю хворобу пов'язують з наявністю нових ізольованих дволанцюгових РНК (длРНК) елементів. Однак длРНК відрізнялися від раніше описаних у *A. bisporus* і від длРНК елементів, характерних для хвороби La France [2, 9]. Було припущено, що цю хворобу індукував неописаний раніше вірус, із характерним длРНК геномом. Його назвали «virus X», а згодом Mushroom Virus X (MVX) [2, 8]. Доведено, що при вірусному захворюванні плодові тіла грибів змінюються морфологічно, втрачаючи при цьому свої смакові якості, мають зменшений термін зберігання і нерідко стають небезпечними для вживання [2, 9].

Мета, завдання та методика досліджень

За мету досліджень було обрано оптимізацію і модифікацію методу виділення, очищення та діагностики дволанцюгових РНК вірусів з культури печериці двоспорової. Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішення таких задач: 1) здійснити скринінг зразків печериці в умовах закритого ґрунту на предмет інфікування вірусами з використанням методів візуальної діагностики плодових тіл та міцелію; 2) адаптувати і вдосконалити методику виділення, очищення та ідентифікації вірусних дволанцюгових РНК (длРНК) з культури грибів. Для аналізів відбирали плодові тіла з вираженими симптомами захворювань. За інфікованими грибами спостерігали протягом усіх хвиль плодоношення. Як контроль були взяті плодові тіла печериці двоспорової, які добирали згідно з результатами візуальної оцінки на ураження та електронно-мікроскопічного аналізу в лабораторних умовах [Бойко 1990, 1999; Grogan, 2002]. Для ідентифікації і виділення вірусних патогенів з печериць застосовували

метод целюлозної хроматографії. Для цієї мети відбирали зразки печериць зі специфічними симптомами, які виражалися у потемнінні, лізисі міцелію, деформації плодових тіл, водянистості ніжок і шапинок, витягнутості ніжок й відмиранні шапинок, утворенні некрозів та пухлин (енацій) на плодових тілах, побурінні міцелію і плодових тіл, різкій зміні морфології, забарвленні тканин плодових тіл тощо [Morris, Dodds, 1979; Rodrigo Valverde, 1990; Мельничук, 2001]. Виділення длРНК з плодових тіл грибів проводили за методиками [Rodrigo Valverde, 1990; Мельничук, 2001] з власними модифікаціями.

Результати досліджень

Ідентифікація фрагментів длРНК фітовірусів є сталою для конкретних представників фіто- і міковірусних патогенів, та являє собою методи діагностики й ідентифікації РНК-вмісних фітовірусів, стадій їх транспорту переносниками (гриби, комахи, нематоди тощо), а також вивчення відмінностей ізолятів РНК вмісних фіто- та міковірусів. Сутність, унікальність і практичність методу виділення, очищення та діагностики дволанцюгових РНК вірусів (рис. 1) полягає у виділенні із загальної кількості нуклеїнових кислот тієї, яка притаманна тільки вірусу – длРНК. Метод уперше був запропонований і опублікований у 1979 році і протягом тридцяти років набував свого поширення та використання. Його специфіка полягає у виявленні дволанцюгової форми вірусної нуклеїнової кислоти, яка практично відсутня у представників рослинного і тваринного світу, а якщо і виділяється, то заодно являє собою нуклеїнову кислоту вірусного походження.

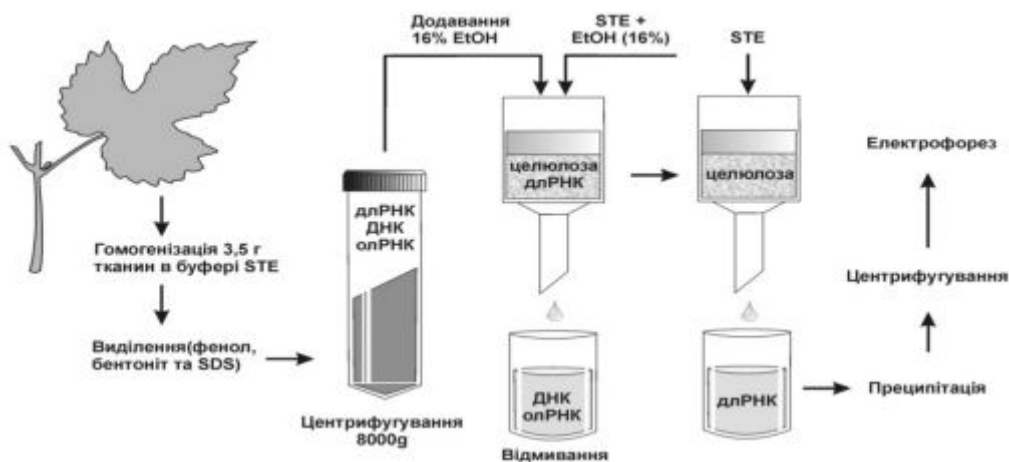


Рис. 1. Загальна схема виділення та хроматографії на целюлозі дволанцюгових РНК рослин (Морріс, Догс)

Діагностика та ідентифікація РНК-вмісних фітовірусів (рис. 2) передбачає, що 3,5 г рослинного зразку (уражені ділянки листя, стебел, коренеплодів, насіння тощо) гомогенізують у буферному розчині STE (0,1 М NaCl, 0,05 М tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 7,0) в умовах рідкого азоту. Після проведення гомогенізації проводять фенольне виділення та очищення загальних нуклеїнових кислот і два цикли целюлозного фракціонування, що включають декілька стадій з використанням 16 % розчину етанолу. Фракцію длРНК після целюлозного фільтрату переводять на STE-буфер без етанолу і концентрують у двох об'ємах охолодженого 95 % етилового спирту та 0,1 об'єму 0,2 М натрій ацетату, pH 5,5.

Проаналізувавши спосіб діагностики та ідентифікації РНК-вмісних фітовірусів, нами виявлено, що запропонована методика виділення у випадку для мікроскопічних й їстівних грибів не забезпечує повною мірою чистоту та достатню концентрацію длРНК вірусів. Запропонований нами спосіб виділення полягає у тому, що за умов використання проби грибів у кількості 10 г отримують зразки, які після гомогенізації в умовах рідкого азоту переносять у центрифужні пробірки, додають 12 мл буфера 2x STE (H₂O – 500 мл, NaCl – 29г, tris – 30,5 г, EDTA – 1,85 г), 1 мл 1 % SDS (H₂O – 100 мл, додицилосульфат натрію – 10 г) і 1мл бентоніту, перемішують на шейкері впродовж 15 хв до утворення однорідної маси. Далі додають 17 мл STE-фенолу (H₂O – 500 мл, 2x STE – 500 мл, pH 4,5) та 17 мл розчину хлороформ-ізоамілу (24 : 1) й центрифугують 20 хв при 2500 об/хв.

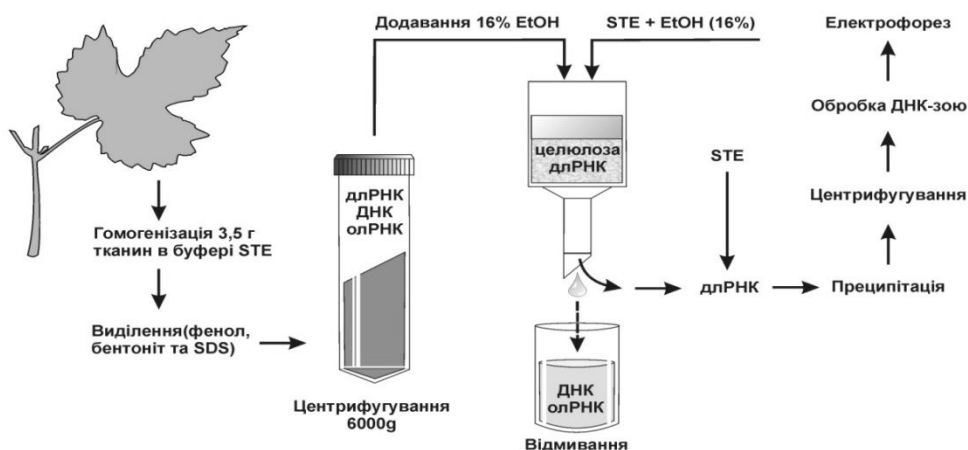


Рис. 2. Загальна схема виділення та хроматографічного очищення дволанцюгових РНК (Валверде, Мельничук)

Після центрифугування відбирають водну фазу і знову центрифугують 10 хв при 8000 об/хв, відбирають надосад з додаванням 1,5 г целюлози і 3 мл абсолютного етанолу, перемішують впродовж 15–20 хв, надалі зразки переносять на лід на 30 хв за температури 15 °С. Вміст пробірок переливають у колонки, додають буфер STE–ОН (STE – 100 мл, етиловий спирт – 174 мл, H₂O – 726 мл) 20 мл та буфер STE – 20 мл. Фільтрати переливають у центрифужні пробірки та додають 30 мл етилового спирту, центрифугують 30 хв при 8000 об/хв, зливають надосад й підсушують на фільтрувальному папері за температури + 18-20 °С протягом 2 год, додають 200 мкл 10X РНК – буферу (0,35 % (w/v) Orange G, 30 % (w/v) Ficoll 400, 1 mM EDTA). В отриманий розчин додають 1 мкл MgCl₂ і переносять в термостат на 1 год за температури + 37 °С.

Завдяки модифікації, що передбачає збільшення маси наважки вихідного матеріалу до 10 г, об'єму STE буфера (30 мл) для первинної відмивки, додавання 50 % від об'єму фенолу, 17 мл хлороформу і 2 мл ізоамілового спирту за умов виділення дволанцюгової вірусної РНК стає можливим підтвердити ефективність запропонованого способу діагностики та ідентифікації РНК-вмісних вірусів мікроскопічних та їстівних грибів. Застосування модифікованого способу ідентифікації РНК-вмісних вірусів мікроскопічних та їстівних грибів забезпечує отримання достатньої концентрації длРНК вірусів для якісного й точного проведення діагностики (рис. 3).

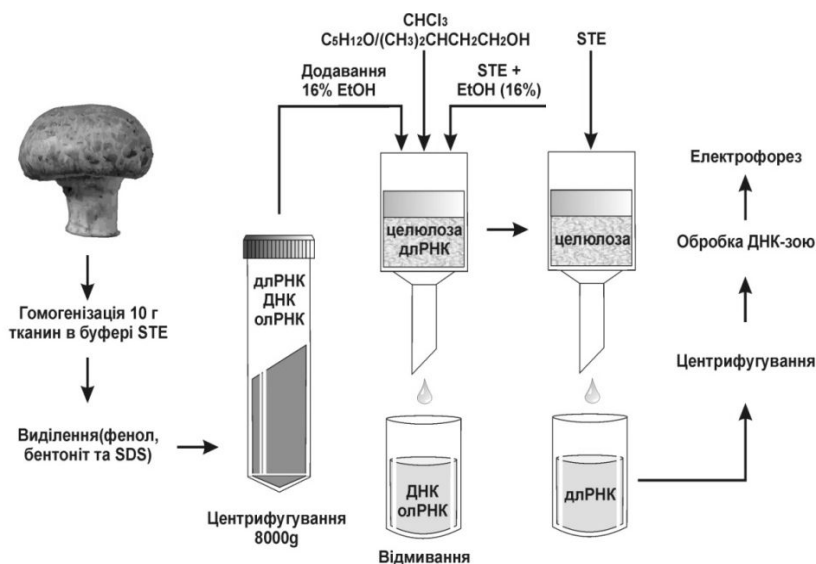


Рис. 3. Модифікований метод хроматографічного очищення длРНК в їстівних грибах

Висновки та перспективи подальших досліджень

На підставі проведених експериментальних досліджень рекомендовано використовувати наважку вихідного матеріалу 10 г, об'єм STE буфера для первинної відмивки 30 мл, додавання 50 % від об'єму фенолу, 17 мл хлороформу і 2 мл ізоамілового спирту при застосуванні методу хроматографічного очищення дЛРНК, що забезпечує якісне проведення діагностики й ідентифікації РНК-вмісних вірусів у мікроскопічних та істівних грибах. Модифікована методика може широко застосовуватись Головною державною фітосанітарною інспекцією при проведенні фітосанітарного контролю печеричних комплексів на державному кордоні та митницях призначення.

Перспективи подальших досліджень слід зосередити у напрямку пошуку шляхів комплексної діагностики міцелію на вірусоносійство з використанням досліджень діагностичних тест-систем на основі ПЛР.

Література

1. *Іванова Т. В.* Особливості виділення сумарної РНК з плодкових тіл печериці двоспорової / *Т. В. Іванова, І. О. Антіпов, В. В. Оверченко* // Біологія: від молекули до біосфери: матеріали V Міжнар. конф. молодих вчених (Харків, 22–25 листоп. 2010 р.). – Харків : Оперативна поліграфія, 2010. – С. 60–61.
2. *Іванова Т. В.* Виявлення вірусних хвороб у плодкових тілах печериці двоспорової (*Agaricus bisporus (J.Lge) Imbach*) [Електронний ресурс] / *Т. В. Іванова* // Наук. доп. НУБіП України – 2011. – № 1(23). – 12 с. – Режим доступу: http://www.nbu.gov.ua/e-ourals/Nd/2011_7/11tvibsm.pdf – Назва з екрана.
3. Characterization of an RNA dependent RNA polymerase activity associated with La France isometric virus. J. / *M. M. Goodin, B. Schlaghauer, T. Weir, C. P. Romaine* // *Virol.* – 1997. – № 71. – P. 2264–2269.
4. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus* / *H. M. Grogan, B. A. Adie, R. H. Gaze* [et al.] // *Mycol. Res.* – 2003. – № 107 (2). – P. 147–154.
5. *Elibuyuk I.* Detection of a virus disease on *Agaricus bisporus* (white button mushroom) in Ankara, Turkey / *I. Elibuyuk, H. Bostan* // *International journal of agriculture & biology.* – 2010. – №12. – P. 597–600.
6. *Mills P. R.* Final Project Report on Defra project HH2304SMU: Characterisation of PHK associated with mushroom Virus X / *P. R. Mills, B. Adie, H. M. Grogan.* – 2002. – 23 p.
7. *Gaze R. H.* A new virus disease of *Agaricus bisporus*? / *R. H. Gaze, L. Calvo-Bado, M. P. Challen* // *In Science and cultivation of Edible fungi.* – Rotterdam : Balkema Publishers. – 2000. – P. 701–705.
8. *Hollings M.* Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom / *M. Hollings* // *Nature.* – 1962. – № 196. – P. 962–968.
9. *Maffettone E.* Characterization of a novel virus associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus*: Phd thesis for the degree of Doctor of Philosophy / *E. Maffettone.* – Cranfield University, 2007. – 273 p.