

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 632.911.2

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ЮЖНОЙ МОЗАИКИ БОБОВ

Н.Г. Бондаренко, К.Н. Магомедова, Н.А. Шилкина

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),

р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

e-mail: reseachergm@mail.ru, kalimat_nur@mail.ru, shinatko@mail.ru

В статье рассматривается вирус южной мозаики бобов (Southern bean mosaic virus, SBMV), особый акцент сделан на фитосанитарный риск при экспорте сои из Российской Федерации. Основной целью работы является разработка высокочувствительного метода идентификации SBMV. В ходе исследования обобщены литературные данные о биологических и молекулярно-генетических характеристиках патогенного вируса, а также о методе его выявления и идентификации, проведена оценка ранее разработанных праймерных систем, в результате чего были созданы собственные праймеры для целевого патогена. Полученные результаты могут способствовать улучшению диагностики и контроля распространения вируса, что имеет важное значение для сельского хозяйства и экспортного потенциала сои в России.

Ключевые слова: ПЦР, вирус, соя, фасоль, диагностика.

Введение

Вирус южной мозаики бобов (SBMV) является типовым видом рода *Sobemovirus* и поражает такие значимые культуры как соя культурная (*Glycine max*), фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris*) вигна китайская (*Vigna unguiculata*) и урд (*Vigna mungo*), вызывая крапчатость и системную мозаику на листовой пластинке. Из перечисленных культур именно Соя является одной из наиболее значимых экспортных видов. В настоящее время вирус южной мозаики бобов имеет карантинный статус для таких стран, как Китай, Иордания, Аргентина, Парагвай, а также распространен в странах Европы, Азии, Америки, Африки. Первое сообщение о вирусе южной мозаики бобов, поразивший фасоль, но не поразивший вигну было из Никарагуа в долине Себако в ноябре 1988 года. Возбудитель был идентифицирован как SBMV штамм фасоли. Также были сообщения из Замбии и Марокко, где вирус поражал фасоль, вызывая просветление жилок и мозаику листьев.

На данный момент в Российской Федерации 80% площадей под сою расположены в Центральном и Дальневосточном ФО. С 2024 года прирост к площади под сою увеличится в 0,4 млн га и может достичь 4 млн га. Только в Амурской области в 2024 году площадь полей под выращивание масличной культуры составит 900 тыс. га. Следом идут центральные регионы: Курская и Белгородская области, где соей засеют 378 тыс. га (343,4 тыс. га в 2023 году) и 315 тыс. га (283,1 тыс. га) соответственно. Расширяются посевы также в Приморском крае и Воронежской области — до 305 тыс. га (294,7 тыс. га) и 250 тыс. га (213,7 тыс. га) соответственно. Отгрузки сои за рубеж идут без изменений к уровню аналогичного периода прошлого года — 1,2 млн т. Для минимизации фитосанитарного риска и обеспечения успешного экспорта зернобобовых культур был разработан быстрый и точный метод идентификации SBMV, который потенциально способен заражать соевые культуры.

Материалы и методы

В данной работе были исследованы образцы сои из разных регионов Российской Федерации и рассмотрены существующие методы идентификации SBMV, с дальнейшей апробацией праймерных систем и секвенированием.

В статье Mulenga et al. (2020) описан способ, который основан на ПЦР с детекцией электрофореза, который позволяет идентифицировать фрагмент РНК вируса южной мозаики (SBMV) длиной 870 п.н. из внутренней области, близкой к 3' концу, кодирующей последовательности ORF2 генома SBMV [6].

В данном способе используется амплификация участка гена 32 п.н. 5'UTR, 492 п.н. белка движения 41 (ORF1) и 353 п.н. частичного гена P2a (ORF2) SBMV с помощью праймеров, комплементарных идентичной последовательности для всех штаммов SBMV. После амплификации проводится электрофоретическое разделение в агарозном геле для подтверждения амплификации нужной длины в 870 пар нуклеотидов.

Результаты

Для создания системы идентификации в режиме реального времени необходимо было определение нуклеотидной последовательности и видовой принадлежности исследованного вируса южной мозаики бобов. Изолят SBMV был использован из ИФА набора DSMZ (Германия).

Для подтверждения правильности видового определения вируса в образце положительного контроля было произведено секвенирование и выравнивание с близкородственными вирусами рода *Собемовирус* (рис. 1).

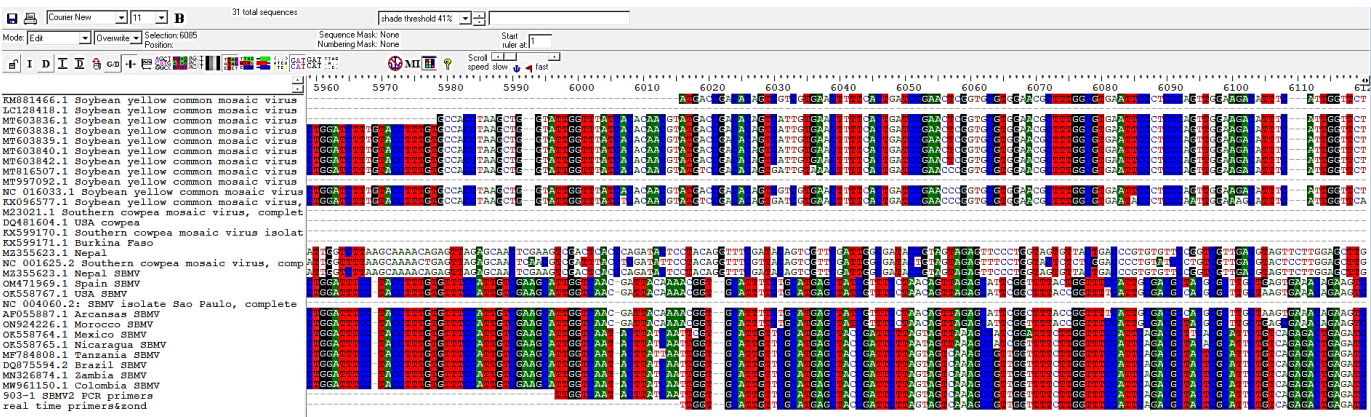


Рисунок 1 Множественное геномное выравнивание штаммов близкородственных Собемовирусов в программе BioEdit (*Southern bean mosaic virus*, *Southern yellow common mosaic virus*, *Southern cowpea mosaic virus*)

С помощью секвенирования ампликона, произведенное методом Сэнгера была получена последовательность в 873 пар нуклеотидов вируса южной мозаики бобов, для которой в дальнейшем разрабатывали олигонуклеотидные праймеры и зонд с помощью программы Primer BLAST (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика праймеров SBMV-K/SBMV-M, зонда SBMV-N, разработанных для проведения скринингового теста на наличие SBMV методом ПЦР РВ.

Название праймера	Последовательность 5'- 3'	Tm, °C	GC, %
SBMV-K	TTGNNNNNTTGTTCGNNNNN	59	45
SBMV-M	NNNNNNAGGAACGTNNNNNN	59	55
SBMV-N	CAGANNNNNNNNNNNNCTGTCTCAGAG	70	54

Разработанный способ диагностики заключается в том, что для выявления SBMV, анализируемую кДНК подвергают ПЦР-амплификации с использованием ДНК-полимеразы, обладающей 5'-экзонуклеазной активностью, двух праймеров и олигонуклеотидного зонда, 5'- и 3'-концы которого связаны с парой флуоресцентный краситель/ «тушитель» по каналу FAM.

Для успешного прохождения ПЦР в реальном времени важно соблюсти температурные режимы (табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации

1 цикл	95°C	3 минуты
40 циклов	95°C	30 секунд
	60°C	30 секунд

Реакционная смесь, конечным объемом 25 мкл, содержала: 13 мкл деонизированной воды, 5 мкл буфера Dialat 5x MAS^{CFGT}, прямой и обратный праймер – 0,8 мкл, зонд – 0,4 мкл, матрицу ДНК – 5 мкл. Концентрация каждого олигонуклеотидного праймера и флуоресцентного зонда составила 10 pmol. Результат ПЦР в реальном времени отслеживалась на мониторе компьютера в виде графиков (рис. 2). ПЦР в реальном времени проводилась на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

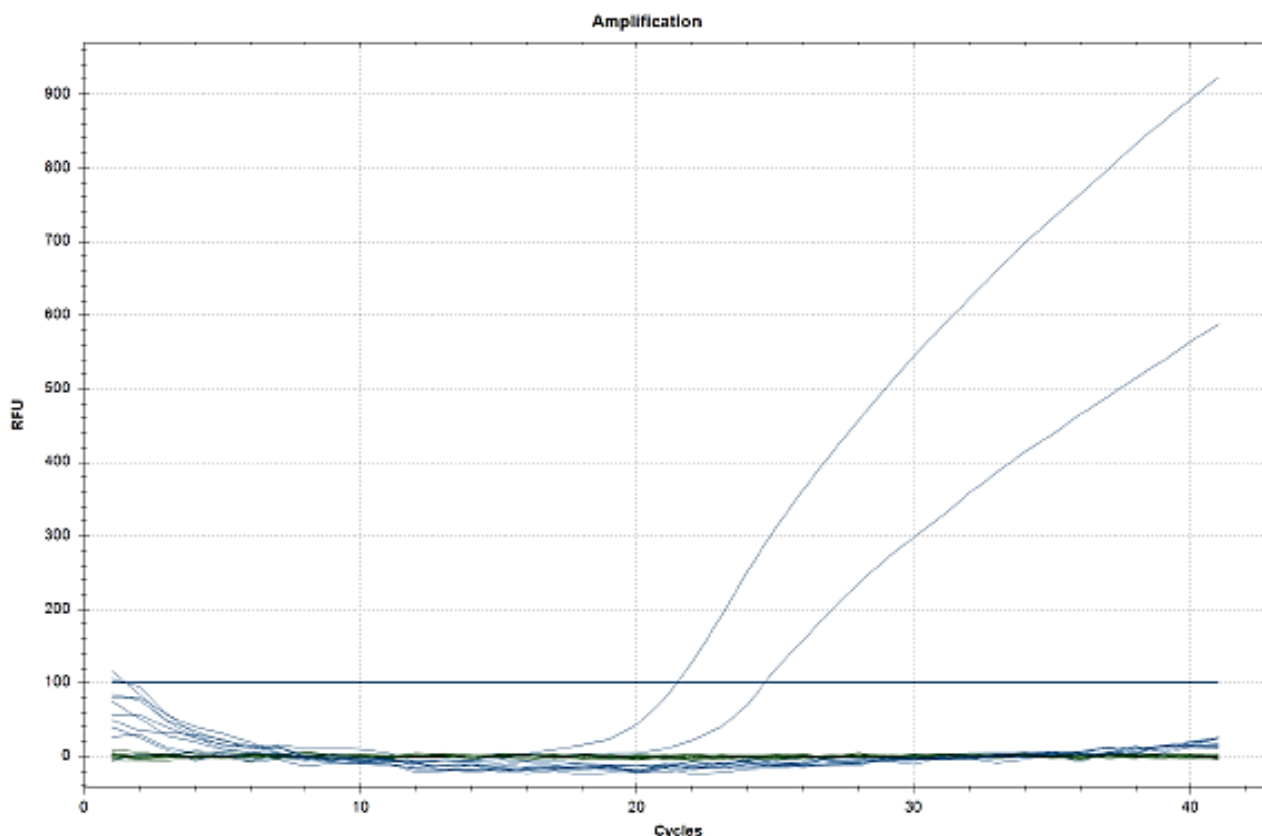


Рисунок 2. Результаты амплификации с синтезированными праймерами (SBMV-K/SBMV-M) и зондом (SBMV-N).

Длительность анализа занимает 1 час 10 минут рабочего времени. Способ позволяет проводить определение 4 штаммов вируса: Танзанский, Бразильский, Замабийский и Колумбийский.

Таблица 3

Данные по процессу амплификации, представленного на рис. 2.

Канал	Образец	Цикл
FAM	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
	4	N/A
	5	N/A
	6	N/A
	Пка	21,43
	Окв	N/A

Примечание: цифрами 1–6 обозначены образцы сои, пка – положительный контроль амплификации, окв – отрицательный контроль амплификации.

Тест–система была также исследована по параметрам аналитической чувствительности для определения минимального порога чувствительности. По выходам кривых нижний порог составил 0,04 нг кДНК. Также при оценке повторяемости и воспроизводимости результаты ПЦР показывали выходы в пределах ожидаемого в 21–24 циклах. При оценке специфичности разработанной системы с близкородственными вирусами и с растениями – хозяевами (фасоль, вигна, соя), графики амплификации показывали выход только на образец, содержащий вирусный патоген SBMV. Тест–система показала высокую специфичность и чувствительность и может быть использована в лабораториях для идентификации вируса южной мозаики бобов на зернобобовых культурах.

Библиографический список

1. Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W., Lesemann D.-E. et al. Southern bean Mosaic Virus the Causal Agent of a New Disease of Phaseolus vulgaris beans in Spain // European Journal of Plant Pathology. 2003. Vol. 109(9). P. 935–941. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003673.10046.2f>
2. Lokesh G.L., Gopinath K., Satheshkumar P.S. et al. Complete nucleotide sequence of Sesbania mosaic virus: a new virus species of the genus Sobemovirus // Archives of Virology. 2001. Vol. 146(2). P. 209–223. <https://doi.org/10.1007/s007050170170>
3. Segundo E., Gil-Salas F.M., Janssen D. et al. First Report of Southern bean mosaic virus Infecting French Bean in Morocco // Plant Disease. 2004. Vol. 88(10). P. 1162. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.10.1162B>
4. Tamm T., Truve E. Sobemoviruses // Journal of Virology. 2000. Vol. 74(14). P. 6231–6241. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.14.6231-6241.2000>
5. Teakle D. Abiotic Transmission of Southern Bean Mosaic Virus in Soil // Australian Journal of Biological Sciences. 1986. Vol. 39(4). P. 353–349. <https://doi.org/10.1071/BI9860353>
6. Mulenga R.M., Chikoti P.C., Chiona M. et al. First Report of Southern bean mosaic virus infecting common bean in Zambia // Plant Disease. 2020. 104(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2390-PDN>