

УДК 634.73:632.38:58.083

Т. Н. БОЖИДАЙ, Н. Н. ВОЛОСЕВИЧ, Н. В. КУХАРЧИК

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ RT-PCR  
ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ  
ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)**

*Институт плодоводства, аг. Самохваловичи, e-mail: tanya\_bozhidaj@mail.ru*

*(Поступила в редакцию 19.02.2015)*

**Введение.** Растения рода *Vaccinium* L. во всем мире подвержены различным вирусным заболеваниям, которые наносят существенный урон насаждениям и, следовательно, требуют больших затрат на мероприятия по ликвидации этих повреждений. В соответствии с нормативными документами Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO) такие вирусные заболевания, как вирус красной кольцевой пятнистости голубики, вирус ожога голубики, вирус шока голубики, вирус нитчатости голубики, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус кольцевой пятнистости томата, вирус листовой крапчатости голубики, вирус розеточной мозаики персика, мозаика голубики, подлежат контролю и не должны диагностироваться в сертифицированном посадочном материале *Vaccinium* spp. [1].

Поскольку степень развития симптомов вирусных болезней значительно варьируется в зависимости от генотипа и погодных условий, наличие вирусной инфекции может быть достоверно установлено только методами молекулярного анализа. Наиболее распространенные методы лабораторной диагностики вирусных патогенов растений во всем мире – иммуноферментный анализ (ELISA) и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (RT-PCR). ELISA подходит для анализа большого числа образцов, однако из-за низких титров вируса и/или ингибирующего эффекта растительных полисахаридов или фенольных соединений имеет некоторые ограничения [2]. Диагностика с использованием RT-PCR является более чувствительным и надежным методом [3, 4]. При этом данные методы (ELISA, RT-PCR) дорогостоящи и трудоемки, особенно при необходимости тестирования большого количества образцов с несколькими патогенами.

Мультиплексная (мультипраймерная) полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (multiplex RT-PCR, mRT-PCR), основанная на коампликации нескольких матриц при одновременном использовании более одной пары олигонуклеотидных праймеров, является перспективным, надежным, быстрым и экономически эффективным методом диагностики вирусных заболеваний растений, так как позволяет выявить несколько возбудителей одновременно в одной реакции [3, 5, 6]. Данный метод был успешно использован для обнаружения различных вирусов яблони [3, 5, 7], груши [3, 8], вишни [9, 10], сливы [10], персика [4, 10], банана [11], земляники [6], оливы [12], орхидеи [13], папайи [14].

В связи с этим разработка mRT-PCR для одновременного выявления нескольких вирусов голубики является актуальной задачей, направленной на своевременную дифференциальную диагностику вирусов с целью оптимизации и удешевления мероприятий по контролю над распространением данных патогенов.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Объекты исследований – вирус ожога голубики (*Blueberry scorch carlavirus*, BScV) и вирус кольцевой пятнистости табака (*Tobacco ringspot nepovirus*, TRSV). Материалом служили лиофилизированные листья растений голубики, пораженных BScV и TRSV.

**Методика выделения РНК.** Для выделения общей РНК использовали коммерческий набор RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN). Выделение проводили в соответствии с методическими указаниями фирмы-производителя.

Лиофилизированный растительный материал (10 мг) растирали пестиком в ступке с жидким азотом до получения пудры. К измельченному материалу добавляли 500 мкл лизирующего буфера RLT с β-меркаптоэтанолом (на 1 мл буфера RLT 10 мкл β-меркаптоэтанол) и продолжали растирать. Затем добавляли еще 300 мкл буфера RLT с β-меркаптоэтанолом, растирали, после чего смесь переносили в 2 мл микроцентрифужные пробирки, интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad), затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

Для удаления остатков нелизировавшихся клеток супернатант переносили на фильтрационные колонки (в 2 мл микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 2 мин при 14 000 об/мин.

К очищенному лизату добавляли 96 %-ный этанол (1/2 объема лизата), перемешивали. Затем смесь переносили на поверхность связывающих колонок (в 2 мл микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 15 с при 10 000 об/мин для связывания РНК.

Далее осуществляли трехкратное промывание мембраны связывающих колонок: 1) добавляли 700 мкл буфера RW1, центрифугировали 15 с при 10 000 об/мин; 2) добавляли 500 мкл буфера RPE, центрифугировали 15 с при 10 000 об/мин; 3) добавляли 500 мкл буфера RPE, центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин. Дополнительный этап центрифугирования (1 мин при 10 000 об/мин) использовали для удаления остатков промывающего раствора с мембран колонок.

Элюирование РНК проводили путем добавления 30 мкл свободной от РНКаз воды и центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 1 мин.

**Методика проведения RT-PCR и mRT-PCR.** Для проведения RT-PCR готовили смесь реакционных компонентов объемом 10 мкл, содержащую свободную от РНКаз воду, 2,0 мкл 5×буфера (QIAGEN), 0,4 мкл dNTP (QIAGEN), по 0,4 мкл каждого праймера, 0,4 мкл смеси ферментов (QIAGEN), 0,4 мкл раствора РНК.

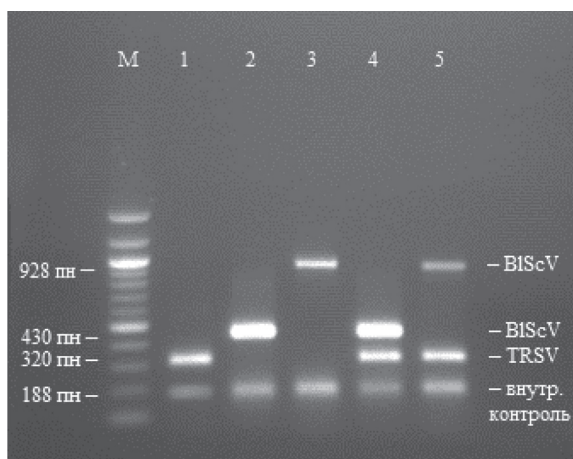
Для проведения mRT-PCR использовали смесь элюированной РНК, содержащую оба вируса (1:1).

Праймеры, использованные для диагностики вирусов, представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Праймеры, использованные для амплификации

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Размер ожидаемого PCR продукта, п. н.	Источник
Вирус ожога голубики ( <i>Blueberry scorch carlavirus</i> , BScV)			
IF	CAGTTATGCCTCCGAAAG	928	L. A. Wegener [15]
IR	CCCGCATTTTCGATGATTGCG		
RDP-1	ATGGCACTCACATACAGAAGTCC	430	E. Paduch-Cichal и соавт. [16]
RDP-2	TGCCTCTTCAATGCACGATGTTT		
Вирус кольцевой пятнистости табака ( <i>Tobacco ringspot nepovirus</i> , TRSV)			
MF05–22-F	CAGGGGCGTGAGTGGGGGCTC	320	M. Fuchs и соавт. [17]
MF05–21-R	CAATACGGTAAGTGCACACCCCG		
Внутренний контроль			
AtropaNad2.1a	GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC	188	J. R. Thompson и соавт. [6]
AtropaNad2.2b	AGCAATGAGATTCCCAATATCAT		

RT-PCR-реакция проводилась на амплификаторе iCycler® 3.032 (Bio-Rad) при следующих заданных параметрах: 50 °C – 30 мин (1 цикл); 95 °C – 15 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 90 с (35 циклов); 72 °C – 7 мин (1 цикл).



Электрофореграмма продуктов амплификации при RT-PCR и mRT-PCR диагностике вирусов голубики (BlScV и TRSV): М – маркер 100 bp DNA Ladder (BioLabs); 1 – MF05–22-F/MF05–21-R, AtropaNad2.1a/2.2b; 2 – RDP-1/RDP-2, AtropaNad2.1a/2.2b; 3 – 1F/1R, AtropaNad2.1a/2.2b; 4 – RDP-1/RDP-2, MF05–22-F/MF05–21-R, AtropaNad2.1a/2.2b; 5 – 1F/1R, MF05–22-F/MF05–21-R, AtropaNad2.1a/2.2b

представители рода *Vaccinium* L., необходимо было оценить работоспособность данных праймеров при работе с РНК растений голубики. В результате RT-PCR анализа с праймерами AtropaNad2.1a/2.2b и РНК, выделенной из растений голубики, были получены ампликоны ожидаемого размера (188 п. н.), что позволяет использовать данную пару праймеров как для оценки качества препарата выделенной тотальной РНК, так и в качестве праймеров внутреннего контроля при тестировании вирусов голубики.

Для подтверждения наличия вируса в растительной ткани были выбраны две пары праймеров к вирусу BlScV (1F/1R, RDP-1/RDP-2) и одна пара праймеров к вирусу TRSV (MF05–22-F/MF05–21-R). В результате тестирования BlScV-содержащего образца были получены фрагменты ожидаемого размера (928 и 430 п. н.) (см. рисунок, дорожки 3 и 2 соответственно). Ампликоны длиной 928 п. н., полученные с использованием праймеров 1F/1R, являлись фрагментом гена белка оболочки вируса, в то время как ампликоны длиной 430 п. н., полученные при использовании праймеров RDP-1/RDP-2, – фрагментом гена, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса (*RdRp*). Тестирование TRSV-содержащего образца с использованием вирусспецифичных праймеров (MF05–22-F/MF05–21-R) позволило амплифицировать часть гена *RdRp* вируса в виде продукта ожидаемого размера (320 п. н.) (см. рисунок, дорожка 1).

Для одновременной диагностики двух вирусов методом mRT-PCR тестировали две комбинации приведенных в табл. 1 праймеров: RDP-1/RDP-2 (BlScV), MF05–22-F/MF05–21-R (TRSV), AtropaNad2.1a/2.2b (внутренний контроль); 1F/1R (BlScV), MF05–22-F/MF05–21-R (TRSV), AtropaNad2.1a/2.2b (внутренний контроль).

В результате амплификации с использованием суммарной РНК, содержащей оба вируса, были получены продукты ожидаемого размера с каждым из двух наборов праймеров (см. рисунок, дорожки 4, 5). Следует отметить, что при тестировании одновременно двух вирусов с внутренним контролем снижение качества электрофореграммы, по сравнению с результатами RT-PCR тестирования одного вируса с внутренним контролем (см. рисунок, дорожки 1–3), установлено не было. Оба набора праймеров могут быть использованы для mRT-PCR дифференциального анализа вирусов BlScV и TRSV.

Следующим этапом нашей работы было сравнение себестоимости проведения диагностики вирусных заболеваний голубики двумя приведенными методами в расчете на одно тестирование

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле и 1×TAE-буфере (Bio-Rad). Результаты электрофореза документировали с помощью аппаратного обеспечения Gel Doc™ EQ System (Bio-Rad) и пакета программ Quantity One® (Bio-Rad).

**Результаты и их обсуждение.** Стандартная схема тестирования РНК-содержащих вирусов методом RT-PCR предусматривает использование двух пар праймеров: одна пара праймеров является специфичной к тестируемому патогену, вторая – отвечает за амплификацию продукта, являющегося внутренним контролем. Для диагностики вирусов голубики в качестве праймеров внутреннего контроля были выбраны праймеры AtropaNad2.1a/2.2b к гену *ndhB*, кодирующему субъединицу НАДН-дегидрогеназного комплекса, разработанные J. R. Thompson и соавт. [6] и апробированные на широком спектре видов растений (землянике, яблоне, черешне, персике, ананасе, томате, подсолнухе, лайме, ежевике и др.). Поскольку в перечне видов в оригинальном исследовании отсут-

Т а б л и ц а 2. Расчет себестоимости проведения диагностики вирусных патогенов голубики, бел. руб.

Статья затрат	RT-PCR диагностика B1ScV	RT-PCR диагностика TRSV	mRT-PCR диагностика B1ScV и TRSV
Заработная плата младшего научного сотрудника	30 237	30 237	30 237
Начисления на заработную плату	10 405	10 405	10 405
Сырье и материалы	467 159	467 159	472 309
в том числе наборы и реагенты	440 547	440 547	441 617
Электроэнергия	3 537	3 537	3 537
Амортизация основных средств	27 786	27 786	27 786
Прочие прямые расходы	80 869	80 869	81 641
Итого прямых затрат	619 993	619 993	625 915
Накладные расходы	18 535	18 535	18 535
Себестоимость одного тестирования	638 528	638 528	644 450

(10 образцов). Для определения себестоимости в расчет были взяты основные виды работ при выполнении RT-PCR анализа, за исключением затрат на выделение РНК (табл. 2).

Как следует из табл. 2, себестоимость одного тестирования (10 образцов) на два вируса с использованием RT-PCR составила 1 277 056 бел. руб., а при применении mRT-PCR – 644 450 бел. руб. Таким образом, использование mRT-PCR для одновременного выявления нескольких вирусов голубики является экономически обоснованным.

**Заключение.** Метод mRT-PCR с использованием двух комбинаций праймеров (1F/1R, MF05-22-F/MF05-21-R, AtropaNad2.1a/2.2b и RDP-1/RDP-2, MF05-22-F/MF05-21-R, AtropaNad2.1a/2.2b) может быть применен для одновременной и дифференциальной диагностики таких патогенов голубики, как вирусы B1ScV и TRSV.

Использование mRT-PCR для выявления вирусных патогенов голубики в сравнении с RT-PCR позволяет снизить затраты на проведение тестирования на 49,5 %.

Авторы выражают благодарность MSc Elzbieta Kalinowska (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Польша) и Dr. Massimo Turina (Istituto di Virologia Vegetale, Италия) за предоставленные для исследований изоляты B1ScV и TRSV.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б15М-031).

## Литература

1. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Vaccinium* spp. EPPO Standards PM 4/18 (1) // Bull. OEPP/EPPO. 1997. Vol. 27. P. 195–204.
2. Menzel W., Zahn V., Maiss E. // J. of Virol. Meth. 2003. Vol. 110. P. 153–157.
3. Hassan M., Myrta A., Polak J. // J. of Virol. Meth. 2006. Vol. 133. P. 124–129.
4. Yu Y., Zhao Z., Jiang D. et al. // Lett. in Appl. Microbiol. 2013. Vol. 57. P. 350–355.
5. Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. // J. of Virol. Meth. 2002. Vol. 99. P. 81–92.
6. Thompson J. R., Wetzel S., Klerks M. M. et al. // J. of Virol. Meth. 2003. Vol. 111. P. 85–93.
7. Ji Z., Zhao X., Duan H. et al. // Acta Virol. 2013. Vol. 57. P. 435–441.
8. Yao B., Wang G., Ma X. et al. // J. of Virol. Meth. 2014. Vol. 196. P. 113–119.
9. Noorani M. S., Awasthi P., Sharma M. P. et al. // J. of Virol. Meth. 2013. Vol. 193. P. 103–107.
10. Jarosova J., Kundu J. K. // Scientia Horticulturae. 2010. Vol. 125. P. 68–72.
11. Liu F., Feng L., Chen X. et al. // J. of Phytopathol. 2012. Vol. 160. P. 622–627.
12. Bertolini E., Olmos A., Martinez M. C. et al. // J. of Virol. Meth. 2001. Vol. 96. P. 33–41.
13. Ali R. N., Dann A. L., Cross P. A., Wilson C. R. // Arch. of Virol. 2014. Vol. 159. P. 3095–3099.
14. Tuo D., Shen W., Yang Y. et al. // Viruses. 2014. Vol. 6. P. 3893–3906.
15. Wegener L. A. // Epidemiology and strain identification of blueberry scorch virus on highbush blueberry in British Columbia: thesis ... master of science in plant virology. Burnaby, 2006.
16. Paduch-Cichal E., Chodorska M., Kalinowska E., Komorowska B. // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. 2014. Vol. 13, N 3. P. 3–11.
17. Fuchs M., Abawi G. S., Marsella-Herrick P. et al. // J. of Plant Pathol. 2010. Vol. 92, N 2. P. 451–459.

T. N. BAZHYDAI, N. N. VALASEVICH, N. V. KUKHARCHIK

**EFFICIENCY OF MULTIPLEX RT-PCR FOR DIFFERENTIAL DETECTION  
OF BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) VIRUSES**

**Summary**

It was found that multiplex RT-PCR (mRT-PCR) method with two combinations of primers (1F/1R, MF05-22-F/MF05-21-R, AtropaNad2.1a/2.2b and RDP-1/RDP-2, MF05-22-F/MF05-21-R, AtropaNad2.1a/2.2b) can be used for the simultaneous and differential detection of blueberry pathogens (*Blueberry scorch carlavirus*, *Tobacco ringspot nepovirus*). Application of mRT-PCR for detection of virus diseases of blueberry plants allows to reduce testing costs on 49.5 % in comparison with simplex RT-PCR.