

УДК 632.3.01/.08:632.92

**А. А. Лопаткин, Ю. Н. Приходько, Т. С. Живаева,
Н. А. Хорина, Ю. А. Шнейдер**

*ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
140150, Россия, Московская область,
г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32,
loparkin86@mail.ru*

МЕТОД ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР: ВИРУСА КАРЛИКОВОЙ МОЗАИКИ КУКУРУЗЫ (MAIZE DWARF MOSAIC VIRUS) И ВИРУСА МОЗАИКИ КОСТРА (BROME MOSAIC VIRUS)

Ключевые слова: зерновые культуры, полимеразно-цепная реакция, MDMV, BMV.

Зерновые культуры – важнейшая группа сельскохозяйственных растений, играющая ключевую роль в экспортном потенциале РФ. Фитосанитарные требования стран-импортеров зерна включают в себя отсутствие вирусных инфекций в поставляемой продукции. Основное значение среди экспортируемых РФ культур имеют кукуруза и пшеница. Следовательно, вирусы этих растений имеют особое экономическое значение. Так вирус карликовой мозаики кукурузы (MDMV) способен снижать урожай кукурузы на 42%. Урожай пшеницы вследствие заражения вирусом мозаики костра (BMV) снижается до 61% [1]. В связи с этим необходимо использование быстрой и точной диагностики вирусов, поскольку тестирование партий, отправляемых на экспорт, должно проходить в кратчайшие сроки.

В ходе данной работы для диагностики вирусов был выбран метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), как наиболее быстрый и точный. Проведена оценка предлагаемых в литературе праймеров и зондов. Все исследуемые ПЦР системы должны были отвечать параметрам высокой чувствительности и специфичности. Для диагностики вируса карликовой мозаики кукурузы были применены праймеры MDMV-F1/MDMV-R1 [2]. В ходе работы было показано, что при температуре отжига праймеров в 55°C, предлагаемой в исходной статье, помимо целевого вируса, также образуется неспецифический ПЦР-продукт с близкородственным вирусом мозаики сахарного тростника (SCMV). Для проведения видоспецифичной диагностики была проведена оптимизация ПЦР путем подбора температуры отжига праймеров. Температура отжига праймеров, при которой в реакции выявлялся только специфический продукт, составила 62°C. Для проведения ПЦР-РВ был выбран интеркалирующий краситель EvaGreen I (рис. 1).

Диагностика вируса мозаики костра так же обрабатывалась в формате ПЦР-РВ, но для детекции результатов использовался TaqMan-зонд. Амплификация проводилась с праймерами BMV-F/BMV-R и зондом BMV-P [3]. Данная реакция показала высокую специфичность и при использовании в качестве матрицы кДНК разных вирусов зерновых ПЦР-продукт образуется только для целевого вируса – BMV (рис. 2).

Оба исследуемый патогена – это РНК-вирусы, следовательно, ПЦР-диагностика проводилась в два этапа: обратная транскрипция и амплификация кДНК с видоспецифичными праймерами.

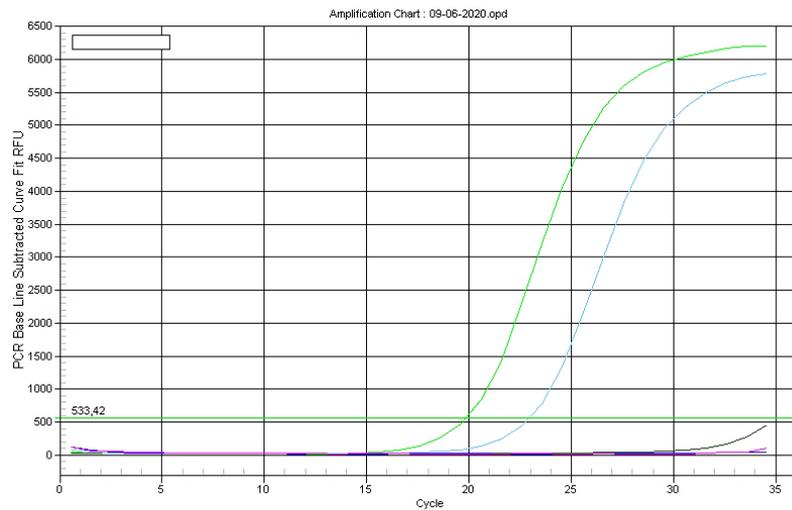


Рисунок 1. Результат ПЦР-РВ на матрице кДНК MDMV (отмечено салатовым и голубым цветами) и SCMV (зеленый и розовый цвет). Синим цветом показан отрицательный контроль

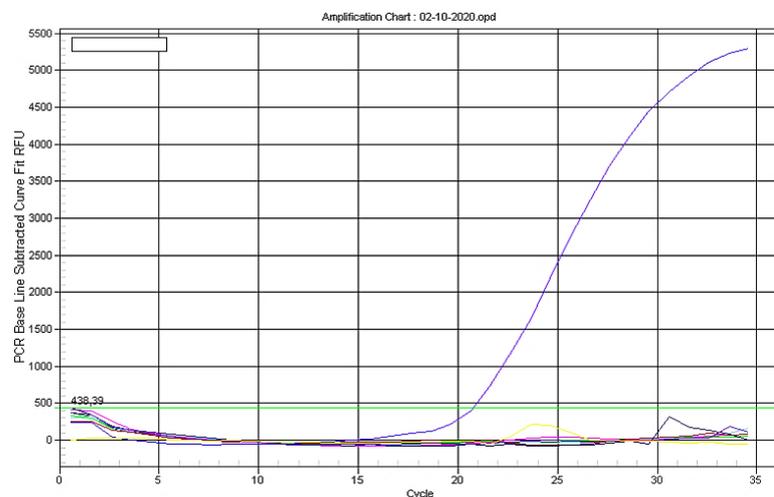


Рисунок 2. Результаты ПЦР-РВ на матрице кДНК BSMV, VaYDV, VaMMV, BMV, WSMV, WDV, BstMV и WSSMV. Положительная реакция показана только для BMV

Таким образом, в ходе исследования отработана диагностика двух вирусов зерновых культур. Показана специфичность применяемых праймерных систем и оптимизированы условия проведения реакции, а так же показана применимость праймеров MDMV-F1/MDMV-R1 для ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем EvaGreen I.

Отработанная ПЦР-диагностика была применена в ходе научного мониторинга в регионах Российской Федерации и показала свою высокую эффективность, как при тестировании зеленой массы, так и для исследования семян растений-хозяев.

Список литературы

1. *Hodge B., Paul P. A., Stewart L. R.* Brome mosaic virus reduces wheat yield in both early and late growth stage infections // *Plant Health in a Global Economy. Abstracts of Poster Presentation.* 2018.
2. *Diagnostic Methods for Maize dwarf mosaic virus.* Diagnostic Protocol 12:54:09 PM (2016). 20 p.
3. *Ferns R. B., Garson J. A.* // *Journal of Virological Methods.* 2006. Vol. 135. P. 102–108.