

УДК 632.911.2

Диагностика ризомании сахарной свеклы

Д.Ю. РЯЗАНЦЕВ, Т.С. ЖИВАЕВА,
Ю.Н. ПРИХОДЬКО, С.К. ЗАВРИЕВ
e-mail: d.yu.ryazantsev@gmail.com

Ризомания является вредоносным заболеванием сахарной, кормовой и столовой свеклы, приводящим к снижению массы корнеплодов на 50–70 %, а содержания сахара – на 4 % и более [6]. Возбудитель ризомании – бенивирус некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС) *Beet necrotic yellow vein benivirus*, BNYVV включен в список А2 Перечня ЕОКЗР под номером 160. Из сопредельных с Россией стран болезнь распространена на Украине, в Казахстане, Киргизии, выявлена в Латвии [4] и до недавнего времени считалась отсутствующей в Российской Федерации.

На основании проведенного анализа фитосанитарного риска (АФР) сделан вывод о необходимости включения возбудителя ризомании в перечни карантинных объектов Российской Федерации и Таможенного союза, которые в настоящее время находятся на стадии утверждения.

Резерваторм и переносчиком ВНПЖС является почвенный гриб *Polymyxa betae* семейства Plasmodiophoraceae [3]. *P. betae* присутствует во всех регионах Европы, возделывающих сахарную свеклу, его неоднократно выявляли и в Российской Федерации. Покоящиеся виофорные споры *P. betae* могут легко распространяться с поливной и паводковой водой, растительными остатками, комочками почвы на сельскохозяйственных орудиях и автотранспорте, а также на корнеплодах свеклы, клубнях картофеля, корнях и корнеплодах овощных культур, выращиваемых на зараженных участках. Навоз также мо-

жет играть роль в распространении болезни, так как споры гриба не теряют инфекционность после прохождения через желудочно-кишечный тракт животных. Отходы сахарного производства, включая жом, и вода, используемая для отмывки корнеплодов, так же могут участвовать в распространении болезни. Споры гриба переносятся ветром [7].

ВНПЖС не передается с семенами и пылью, однако возможно его распространение с комочками почвы и пылью, которые загрязняют семена и содержат цистоспоры *P. betae* [9]. Высушенные зараженные корни и суховоздушная почва могут сохранять виофорные споры *P. betae* более 15 лет. Аналогичная длительность сохранения инфекционности наблюдается и в полевых условиях. Так, развитие ризомании было отмечено на участках, на которых какие-либо культуры не выращивали на протяжении 10–15 лет [3].

Вирионы ВНПЖС – палочковидные, со спиральной симметрией и центральным каналом, их диаметр около 20 нм, а длина 390, 265, 105, 90 и 80 нм (соответствует 5 молекулам геномной РНК) [9]. РНК1 и РНК2 кодируют гены, вовлеченные в репликацию, сборку вирионов и межклеточный транспорт, тогда как РНК3–5 связаны с векторной передачей вируса и развитием болезни на растениях. Вирионы образуют небольшие агрегаты, беспорядочно распределенные в цитоплазме инфицированных клеток. В этих агрегатах они располагаются под углами 45° и 90° друг к другу.

Учитывая многообразие источников распространения виофорных спор переносчика, широкую встре-

чаемость болезни в сопредельных с Российской Федерацией странах и отсутствие контроля ВНПЖС во ввозимой растительной продукции, можно сделать вывод, что ризомания могла достаточно легко проникнуть на территорию Российской Федерации.

В 2007 г. сотрудниками ВНИИ сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова РАСХН и ВНИИКР было проведено обследование сахарной свеклы в Белгородской, Воронежской, Липецкой и Тамбовской областях с отбором образцов для лабораторной экспертизы. Для тестирования отбирали слаборазвитые корнеплоды с симптомами ризомании – чрезмерным образованием боковых корешков, появлением мочковатости или разрастанием корешков в виде «бороды».

Тестирование отобранных образцов проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) в лаборатории вирусологии ВНИИКР, используя набор фирмы «Loewe» (Германия). Часть образцов была проанализирована при помощи тест-системы фирмы «Agdia Inc.» (США). В тестах использовали планшеты для ИФА «Maxisorp» фирмы «Nunk». Обе тест-системы и планшеты «Maxisorp» рекомендованы ЕОКЗР для диагностики ВНПЖС [5]. Для тестирования использовали нижнюю треть корнеплодов с всасывающими корешками. Параллельно на наличие ВНПЖС были протестированы зараженные ризоманией корнеплоды сахарной свеклы, полученные нами из Главной государственной инспекции по карантину растений Украины.

ВНПЖС был выявлен в 19 из 139 тест-образцов корнеплодов сахарной свеклы: в гибридах Манон, Орикс, Аляска, Пират, ХМ 1820 из Рамонского, Семилукского и Панинского районов Воронежской области, а также в образцах сахарной свеклы из Белгородской и Липецкой областей.

В 16 зараженных ризоманией украинских корнеплодах была выявлена высокая концентрация ВВПЖС. При использовании тест-системы «Loewe» значения экстинкции для этих образцов составили 0,243–1,116 о.е. (в среднем – 0,649 о.е.) при 1,170 о.е. в положительном контроле. При анализе этих образцов тест-системой фирмы «Agdia Inc.» значения экстинкции колебались от 0,356 до 3,214 о.е. (в среднем – 1,790 о.е.) при 1,667 о.е. в положительном контроле. В выявленных нами сероположительных образцах из Центрально-Черноземного региона Российской Федерации значения экстинкции составили 0,218–0,805 о.е.

Согласно диагностическому протоколу ЕОКЗР [5], методы выявления ВВПЖС подразделяют на отборочные (ИФА, иммунохроматография, биотесты на травянистых растениях-индикаторах) и подтверждающие (ИФА, ПЦР, иммуноспецифическая ПЦР, электронная микроскопия). Идентификация ВВПЖС в исходном растении или в инокулированном растении-индикаторе должна проводиться методом ИФА и/или ПЦР, а тест, подтверждающий полученный результат, должен быть проведен методом, отличным от отборочного.

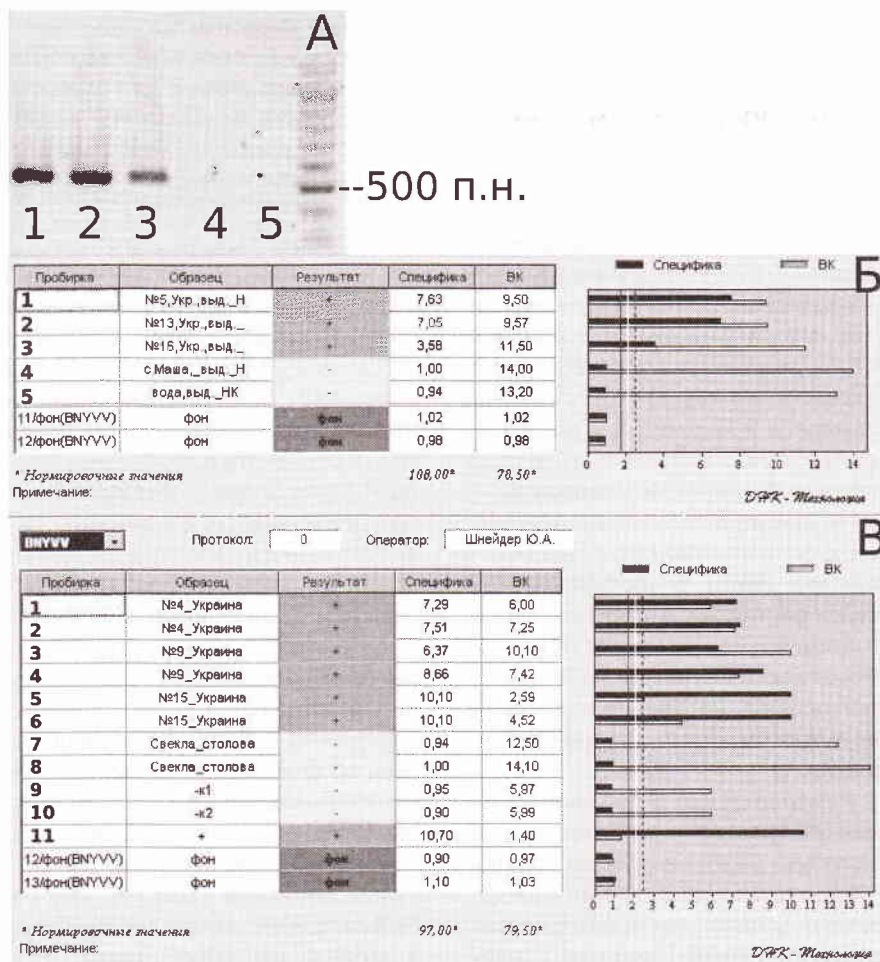
Коммерческие тест-системы для ИФА к ВВПЖС производятся рядом зарубежных фирм, тогда как коммерческие тест-системы к ВВПЖС на основе метода ПЦР в настоящее время выпускает только фирма ООО «АгроДиагностика» (Россия). Именно эти системы мы использовали в настоящей работе. Выделение РНК проводили с использованием набора «Проба НК» ООО «АгроДиагностика» по протоколу производителя.

ПЦР проводили с праймерами 017R/016F [8], рекомендованными в диагностическом протоколе ЕОКЗР [5] (подобрены к гену, кодирующему капсидный белок, размер ампли-

кона 500 п.н.) и с использованием набора для детекции вируса ризомании сахарной свеклы производства ООО «АгроДиагностика» по протоколу производителя (ПЦР в формате FLASH, праймеры подобраны к гену, кодирующему капсидный белок, размер ампликона 320 п.н.).

Для работы с праймерами, реко-

мендованными ЕОКЗР, реакцию обратной транскрипции проводили с праймером ВВПЖС 017R с реактивами фирмы «Диалат» (Россия) по протоколу производителя. Реакцию амплификации проводили с 10-кратной готовой смесью фирмы «Диалат» и праймерами 017R/016F по программе 96 °С – 15 мин.,



Результаты анализа корнеплодов сахарной свеклы на наличие ВВПЖС методом ПЦР с праймерами, рекомендованными ЕОКЗР (А), с набором производства ООО «АгроДиагностика» (Б, В).

Нумерация образцов на фото А и Б: 1 – корнеплод № 5, ВВПЖС, Украина; 2 – корнеплод № 13, ВВПЖС, Украина; 3 – корнеплод № 16, ВВПЖС, Украина; 4 – корнеплод сорта Маша, Воронежская область, серонегативная реакция к ВВПЖС, 2011 г.; 5 – вода.

Нумерация образцов на фото В: 1–6 – зараженные ризоманией корнеплоды сахарной свеклы (№№ 4, 9 и 15), Украина, 2007 г. (имели типичные симптомы ризомании и стабильную сероположительную реакцию с антисыворотками к ВВПЖС фирм АСД и «Loewe»); 7–8 – здоровые корнеплоды столовой свеклы; 9–10 – отрицательный контроль; 11 – положительный контроль

35 циклов (95 °С – 30 сек., 63 °С – 30 сек., 72 °С – 2 мин.), 72 °С – 7 мин. После амплификации продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

При работе с наборами ООО «АгроДиагностика» обратную транскрипцию и ПЦР с детекцией результатов в формате FLASH проводили с использованием реактивов и по протоколам этой фирмы. Следует отметить, что тест-система производства ООО «АгроДиагностика» имеет положительный контроль и систему внутреннего контроля (ВК), позволяющую отслеживать возможное ингибирование ПЦР и ошибки при постановке реакции, приводящие к ложноотрицательному результату. Система FLASH позволяет проводить детекцию результатов на флуориметре «Джин» без постановки электрофореза, что снижает риск контаминации рабочей зоны продуктами амплификации, а также уменьшает время и трудоемкость анализа. При этом результат детекции ВМПЖС отражается синим столбиком (канал FAM, специфика) и обозначается знаком «+» или «–», в зависимости от того, превышает ли уровень флуоресценции пороговые значения; результат детекции ВК показывается зеленым столбиком (канал детекции HEX, ВК) [1, 2].

В качестве примера на фото приведены результаты анализа корнеплодов сахарной свеклы на зараженность вирусом некротического пожелтения жилок свеклы.

Результаты ПЦР, полученные с использованием набора ООО «АгроДиагностика» (фото Б), полностью соответствуют результатам, полученным с использованием праймеров, рекомендованных ЕОКЗР (фото А). На электрофореграмме четко видно наличие фрагментов размером 500 п.н. в образцах 1–3. Для этих образцов также был получен положительный результат в

окне программы «Gene» при детекции результатов в формате FLASH. В образцах здоровых корнеплодов, а также в отрицательных контрольных образцах отсутствует специфический фрагмент и не детектируется флуоресценция в канале FAM (специфика). В этих образцах детектируется только сигнал ВК, что свидетельствует об отсутствии

ингибиторов ПЦР и прохождении амплификации.

Таким образом, показано, что использование метода ПЦР и, в частности, тест-системы производства ООО «АгроДиагностика», позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью четко детектировать вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рязанцев Д.Ю., Абрамов Д.Д., Завриев С.К. Диагностика карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH // Сельскохозяйственная биология, 2009, № 3, с. 114–117.
2. Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Эффективный метод диагностики и идентификации вирусных патогенов картофеля // Молекулярная биология, 2009, 43(3), с. 558–567.
3. Abe H., Tamada T. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae* // J. gen. Virol. 1989, 70, p. 3391–3398.
4. EPPO PQR, 2012.
5. EPPO. *Beet necrotic yellow vein virus (benyvirus)*. Diagnostic protocols for regulated pests. EPPO Standard PM 7/30(2) // Bulletin OEPP/EPPO, 2006, Vol. 34. P. 429–440.
6. EPPO/CABI. *Beet necrotic yellow vein virus*. In: Quarantine pests for Europe. 2nd edition (Ed. by I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, M. Horderness) CAB. International, Wallingford, UK, 1996.
7. Heijbroek W. Dissemination of rhizomania by soil, beet seeds and stable manure // Netherlands Journal of Plant Pathology, 1988, 94, p. 9–15.
8. Morris J., Clover G.R.G., Harju V.A., Hugo S.A. & Henry C.M. Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for *Beet necrotic yellow vein virus* detection // Journal of Virological Methods, 2001, 95, p. 163–169.
9. Tamada T. *Beet necrotic yellow vein virus*. Description of plant viruses, 2002, № 391.

Аннотация. Статья посвящена апробации метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для детекции вируса некротического пожелтения жилок сахарной свеклы – возбудителя ризомании. Проведено сравнение выявления патогена методом ПЦР при помощи коммерческого набора производства ООО «АгроДиагностика» с тест-системой на основе праймеров, рекомендованных ЕОКЗР, а также с серологическими методами. Показано, что тест-система производства ООО «АгроДиагностика» позволяет детектировать вирус некротического пожелтения жилок с высокой чувствительностью и специфичностью.

Ключевые слова. Вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы, ВМПЖС, сахарная свекла, ризомания, полимеразная цепная реакция, ПЦР, молекулярная диагностика, FLASH, флуоресценция.

Abstract. The paper deals with polymerase chain reaction (PCR) detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV, the causative agent of rhizomania disease. We compared the pathogen detection using a commercial kit manufactured by the «AgroDiagnostica» company and the test system based on the primers recommended by the European and Mediterranean associations for quarantine and plant protection, as well as serological methods. The PCR test system manufactured by «AgroDiagnostica» advanced high sensitivity and specificity detection of the BNYVV.

Keywords. *Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV, sugar beet, rhizomania, polymerase chain reaction, PCR, molecular diagnostics, FLASH, fluorescence.

Институт биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ФГБУ «ВНИИКР»,
ООО «АгроДиагностика»