

УДК 632.38

ПЦР-диагностика андийских вирусов картофеля

Д.Ю. РЯЗАНЦЕВ,
П.Е. ДРОБЯЗИНА, С.К. ЗАВРИЕВ
e-mail: Polina.drobyazina@gmail.com

Анди́йский (Южноамериканский) регион является центром происхождения как картофеля, так и его болезней. Здесь наблюдается наибольшее разнообразие патогенов картофеля, среди которых выделяют четыре вируса, внесенных в Перечень карантинных объектов РФ (Список отсутствующих на ее территории). В их числе – андийский латентный вирус картофеля (АЛВК) и андийский вирус крапчатости картофеля (АВКК).

На дикорастущих видах картофеля, пораженных АЛВК, отмечают довольно четкие симптомы как при первичной, так и вторичной инфекции, тогда как на культурном картофеле при первичной инфекции заболевание чаще протекает бессимптомно, иногда может наблюдаться мозаичность или сетчатое пожелтение жилок, а при вторичной инфекции развивается мозаика, нередко с некротической крапчатостью, скручиванием и некрозом верхушки листьев. АЛВК переносится непersistентным способом блошками из рода *Epitrix*, контактным путем от зараженных клубней, а также находящимися семенами [4].

Анди́йская крапчатость картофеля при первичной инфекции проявляется в виде слабой мозаичной окраски листьев, а при вторичной – в их ярко выраженной крапчатости. Иногда наблюдается деформация листьев, некротические поражения участков тканей, общее угнетение растения. Восприимчивые сорта могут реагировать первоначальным системным верху-

шечным некрозом, деформацией листьев и задержкой роста [2]. Вирус переносится насекомыми из родов *Diabrotica* и *Epitrix*, а также при контакте с зараженными клубнями и растениями.

В случае обоих вирусов симптомы инфекции в большей степени проявляются в прохладную погоду.

География ввоза в Россию семенного и продовольственного картофеля ежегодно расширяется. Картофель из зон распространения андийских вирусов (Гондурас, Чили, Никарагуа, Боливия, Колумбия, Эквадор, Перу и Бразилия) ввозится и как важный источник генов хозяйственно ценных признаков (содержание микроэлементов и важнейших антиоксидантов, например, витамина С, полифенолов, каротиноидов). Интенсивный международный обмен селекционным материалом и гермоплазмой в виде клубней, корневых черенков создает

риск заноса андийских вирусов. Опасность для нашей страны представляет не только зараженный андийскими вирусами семенной, но и продовольственный картофель, который может попасть с прилавков рынков и магазинов в качестве посадочного материала на приусадебные участки. Поэтому все клубни, предназначенные для посадки или прямого потребления, должны проходить досмотр и лабораторную экспертизу на наличие карантинных объектов, в том числе андийских вирусов.

Для реализации карантинных мер защиты от проникновения на территорию России АЛВК и АВКК необходимы быстрые, высокотехнологичные методы лабораторной экспресс-диагностики подкарантинной продукции.

Применявшиеся ранее методы диагностики этих вирусов имеют ряд ограничений. Метод растений-индикаторов [1] требует высокой квалификации персонала и значительных затрат времени, серологические методы детекции [3, 5] – дорогостоящих высококачественных антител, к тому же чувствительность обоих методов невысокая и ни один из них не может обеспечить контроль за постоянно растущими объемами ввозимой продукции. Альтернативой могут стать молекулярные методы детекции АЛВК и АВКК, например, на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Они позволяют быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью определять наличие анализируемого вируса даже при его низком содержании в образцах и при латентной инфекции.

ПЦР основана на способности фермента ДНК-полимеразы проводить удвоение молекулы ДНК, начиная с двухцепочечного участка (затравки). В процессе ПЦР на первом этапе при температуре 94 °С происходит раз-



1. Этапы проведения анализа подкарантинной продукции на наличие АЛВК и АВКК методом ПЦР в «реальном времени»

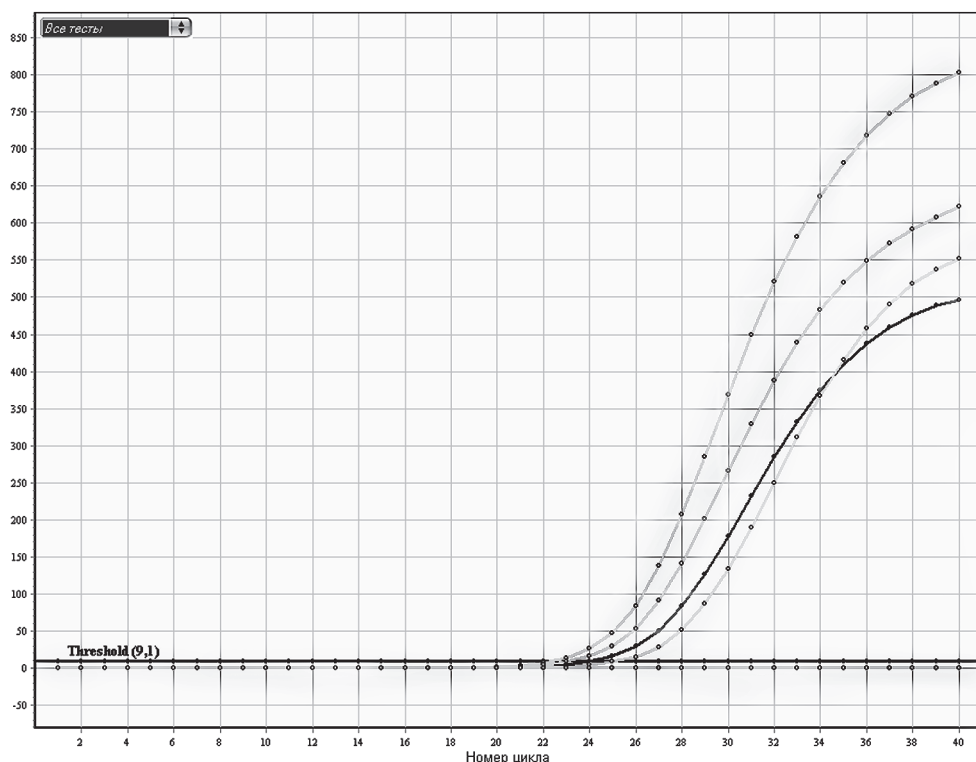
деление двойной спирали ДНК (денатурация), затем температуру понижают до 55–70 °С, при которой с одноцепочечной ДНК могут взаимодействовать специальные олигонуклеотиды – праймеры (так называемый отжиг праймеров), которые и обеспечивают заправку для ДНК-полимеразы. Правильность подбора праймеров определяет специфичность и чувствительность ПЦР. За этапами денатурации и отжига идет этап собственно полимеризации ДНК (при 60–72 °С). Эти три этапа (денатурация, отжиг и полимеризация) повторяются 25–50 раз (циклов) путем последовательного выдерживания определенных температур в термоциклере. За каждый цикл количество фрагмента ДНК, ограниченного праймерами, удваивается, и после прохождения ПЦР его можно обна-

ружить каким-либо физико-химическим методом. В классическом ПЦР это метод электрофореза в агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя. Но он малопригоден для диагностики из-за трудоемкости и возможности загрязнения рабочей зоны продуктами ПЦР, что приводит к ложноположительным результатам. Для диагностических целей лучше всего подходит метод ПЦР в «реальном времени». В этом случае необходимо, чтобы после каждого цикла удвоения продукта ПЦР можно было подсчитать его количество. Для этого в реакционную смесь или вводят интеркалирующий краситель (например, SybrGreen), или используют специальные флуоресцентно-меченые зонды. В любом из этих случаев нарастание количества продукта ПЦР можно наблюдать по

увеличению уровня флуоресценции в пробирке.

В нашем исследовании мы остановились на качественной детекции АЛВК и АВКК методом ПЦР в формате «реального времени», который позволяет проводить полностью автоматизированную детекцию результатов ПЦР непосредственно в пробирке, не открывая ее, что ускоряет процесс анализа и минимизирует вероятность загрязнения рабочей области. Этот формат оптимален для рутинных анализов большого объема исследуемого материала, в частности, в условиях карантинной лаборатории, а при минимальной доработке набора для ПЦР детекции в формате «реального времени» позволяет проводить и количественное определение патогена.

Схема анализа образцов растительного материала на наличие АЛВК



№	Идентификатор	Fam Ct	Hex Ct	Качественный анализ
B2	1 АВКК		32,0	-
B3	2 АВКК		32,9	-
B4	3 АВКК		32,4	-
B5	4 АВКК		31,3	-
B6	5 АВКК		31,5	-
B7	6 АВКК		31,9	-
B8	1 АЛВК		32,3	-
B9	2 АЛВК	24,4	32,1	+
B10	3 АЛВК		32,8	-
B11	4 АЛВК	24,2	31,1	+
C2	5 АЛВК		32,3	-
C3	6 АЛВК	24,0	33,3	+
C4	К+ АЛВК	22,2		+
C5	К- АЛВК		33,1	-
C6	К+ АВКК	23,0		+
C7	К- АВКК		32,2	-

2. Результаты анализа растений картофеля на наличие АЛВК и АВКК методом ПЦР в «реальном времени».

Обозначения: В2–В7 – растения картофеля, которые по данным серологических тестов не содержат АВКК; В8–В11, С2–С3 – по данным серологических тестов не содержат АЛВК; С5 и С7 – по данным серологических тестов не содержат соответственно АЛВК и АВКК; С4 и С8 – положительные контрольные образцы, которые по данным серологических тестов содержат соответственно АЛВК и АВКК

и АВКК включает следующие этапы: выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции, проведение реакции ПЦР с одновременной детекцией результатов, получение протокола результатов анализа (рис. 1). Длительность проведения анализа в среднем составляет 3 ч 10 мин.

Первые два этапа проведения детекции АЛВК и АВКК (рис. 1) могут выполняться с использованием наборов реагентов, выпускаемых различными коммерческими, преимущественно зарубежными, фирмами. При разработке тест-систем для ПЦР-диагностики АЛВК и АВКК нами были опробованы различные комплекты реагентов для выделения РНК и процедуры обратной транскрипции, осуществлена оптимизация проведения этих процедур и адаптация их к наборам, выпускающимся на территории РФ. В результате для выделения РНК как АЛВК, так и АВКК был выбран набор «Проба-НК» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва), а для проведения обратной транскрипции в случае детекции обоих вирусов – комплект реагентов, производимый той же фирмой. В качестве мишени для видоспецифичной идентификации как АЛВК, так и АВКК были выбраны соответствующие гены, кодирующие белок оболочки [6, 7, 8]. К этим последовательностям подобраны пары праймеров и зонды типа TaqMan (гидролизруемые зонды), меченные флуорофором FAM, для проведения качественной детекции в формате «реального времени». После проведения амплификации с подобранными парами праймеров и TaqMan зондами детектирующий термочиклер автоматически выдает протокол результатов с указанием положительных и отрицательных образцов (рис. 2).

Разработанные тест-системы для идентификации АЛВК и АВКК имеют ряд особенностей, позволяющих использовать их для рутинных анализов, например, в карантинных лабораториях. Для предотвращения неспецифического отжига праймеров при низкой температуре и обес-

печения сохранности наборов смесь для проведения ПЦР разделена парафином разного цвета, что одновременно обеспечивает цветовую маркировку пробирок для разных тест-систем. Также каждая тест-система снабжена внутренним контролем, состоящим из плазмиды-матрицы, пары праймеров и зонда TaqMan, меченного флуорофором HEX. Такой контроль позволяет оценить качество прохождения ПЦР.

Тест-системы прошли испытания на образцах кДНК, полученных из ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха (ВНИИКХ, Московская область) (рис. 2). Каждый тест для каждого вируса опробован в 4 повторностях. Все образцы кДНК, положительные на наличие АЛВК и АВКК по результатам серологических исследований, проведенных во ВНИИКХ, давали положительный результат при тестировании соответствующей тест-системой, а большинство образцов, отрицательных по АЛВК и АВКК, – отрицательный при положительном внутреннем контроле, за исключением образцов номер В9, В11 и С3, в которых ПЦР-тест показал наличие АЛВК. Это свидетельствует о большей чувствительности ПЦР-тестов по сравнению с серологическими.

Наборы для проведения ПЦР-идентификации АЛВК и АВКК в формате «реального времени», разработанные в рамках данного исследования, в настоящее время производит ООО «АгроДиагностика», Россия (www.agrodiagnostica.ru). Данные наборы протестированы и используются в ФГБУ Всероссийский центр карантина растений (Московская область, Россия).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fribourg C.E., Jones R.A.C., Koenig R.* Andean potato mottle, a new member of the Cowpea mosaic virus group // *Phytopathology*, 1977, № 67, p. 969–974.
2. *Fribourg C.E., Jones R.A.C., Koenig R.* Andean potato mottle virus // *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 1979, № 203.
3. *Fribourg C.E., Nakashima J.* An improved latex agglutination test for routine

detection of potato viruses // *Potato Research*, 1984, № 27, p. 237–249.

4. *Jones R.A.C., Fribourg C.E.* Symptoms induced by Andean potato latent virus in wild and cultivated potatoes // *Potato Research*, 1978, № 21, p. 121–127.

5. *Koenig R., Bode O.* Sensitive detection of Andean potato latent and Andean potato mottle viruses in potato tubers with the serological latex test // *Phytopathologische Zeitschrift*, 1977, № 92, p. 275–280.

6. *Krengiel R., Vicente A.C.P., Weyne M.* et al. Molecular cloning and sequence analysis of a segment from Andean potato mottle virus B RNA encoding the putative RNA polymerase // *Journal of General Virology*, 1993, № 74, p. 315–318.

7. *Kreuze J., Koenig R., De Souza J.* et al. The complete genome sequences of a Peruvian and a Colombian isolate of Andean potato latent virus and partial sequences of further isolates suggest the existence of two distinct potato-infecting tymovirus species // *Virus Res*, 2013, № 173, p. 431–435.

8. *Shindo N., Krengiel R., Brioso P.S.T.* et al. Complete nucleotide sequence of the 22 kDa coat protein of Andean potato mottle virus // *Plant Molecular Biology*, 1992, № 19, p. 505–507.

Аннотация. Статья посвящена разработке и применению тест-систем для детекции андийского латентного вируса картофеля (АЛВК) и андийского вируса крапчатости картофеля (АВКК) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в формате «реального времени». Показана высокая чувствительность и специфичность разработанных тест-систем. Тест-системы производит ООО «АгроДиагностика» (Москва).

Ключевые слова. Андийский латентный вирус картофеля, андийский вирус крапчатости картофеля, полимеразная цепная реакция, ПЦР в «реальном времени», молекулярная диагностика.

Abstract. The paper deals with Real-Time polymerase chain reaction (PCR) detection of Andean potato latent virus (APLV) and Andean potato mottle virus (APMoV). The PCR test systems developed advanced high sensitivity and specificity detection of the APLV and APMoV. PCR test systems manufactured by «AgroDiagnostica» (Moscow).

Keywords. Andean potato latent virus, Andean potato mottle virus, polymerase chain reaction, Real-Time PCR, molecular diagnostics.

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