

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСТРАКЦІЇ НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ ВІРУСНОЇ ПРИРОДИ З ПЕЧЕРИЦЬ

**Т. В. ІВАНОВА, кандидат сільськогосподарських наук
Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

В результаті аналізу нуклеїнової кислоти, виділеної з плодових тіл печериці, встановлено наявність вірусної інфекції.

Присутність фрагментів длРНК вірусного походження збігається з даними щодо можливості ураження грибів вірусами. Адаптовано методику виділення та хроматографічного очищення дволанцюгових РНК з рослин на целюлозі. Про ефективність запропонованого нами способу виділення длРНК із плодових тіл печериці двосporової свідчить ідентифікація вірусних патогенів за допомогою вищеописаної технології.

Вірусна хвороба, печериця двоспорова, екстракція, ідентифікація, длРНК

Першочерговою умовою отримання високих врожаїв печериці є впровадження у виробництво високоякісного посівного матеріалу, який матиме високу стійкість та буде вільний від вірусів (Grogan, Gaze, Maffettone, Бойко, Іванова).

Більшість культивованих видів грибів є юстівними та лише деякі мають лікувальні властивості. Серед них, печериця двоспорова (*Agaricus bisporus*) (J. Lge) Imbach) на частку якої припадає понад 40 % загального обсягу виробництва грибів.

Останніми часом вірусні хвороби стали одними з найбільш небезпечних для грибних культур. Для культури *A. bisporus* описано понад десять патогенних вірусів, для ідентифікації яких практично відсутні високочутливі методи. Державні програми з розвитку грибівництва сприяють поступовому відновленню і розширенню площ виробництва. На сьогодні в Україні практично не існує молекулярно-біологічних діагностикумів для ідентифікації міковірусів, які уражують печериці.

В останні роки вірусні хвороби стали дуже поширеними за промислового виробництва грибів. Англійські вчені наприкінці 90-х років

XX століття повідомили про зниження врожаю грибів, причини якого не

змогли встановити. Кілька симптомів відповідали захворюванню на La France, але діагностичні тести для сферичного вірусу показували негативні результати. Також цю хворобу пов'язували з наявністю нових ізольованих дволанцюгових РНК (длРНК) елементів. Однак длРНК відрізнялись від раніше описаних в *A. bisporus* і від длРНК елементів, характерних для хвороби La France. Цю хворобу індукував неописаний раніше вірус із характерним длРНК геномом, який назвали *MushroomVirus X* (MVX) [4-8, 9].

Доведено, що за вірусного захворювання плодові тіла грибів змінюються морфологічно, втрачаючи при цьому свої смакові якості і нерідко стають небезпечними для вживання. Також вони не тільки знижують урожай печериць, а й призводять до повної загибелі міцелію.

Мета дослідження – удосконалення діагностики вірусів грибів, адаптація методики виділення, очищення вірусних дволанцюгових РНК (длРНК) з культури грибів.

Матеріали і методи досліджень:

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішення таких задач:

1. Здійснити скринінг зразків печериці в умовах закритого ґрунту на предмет інфікування вірусами з використанням методів візуальної діагностики плодових тіл і міцелію.
2. Вивчити поширеність вірусних хвороб печериці в умовах господарств закритого ґрунту Київської області.
3. Адаптувати і вдосконалити методику виділення, очищення та ідентифікації вірусних дволанцюгових РНК (длРНК) з культури грибів.

Об'єкт дослідження – молекулярно-біологічна діагностика вірусних захворювань грибних культур.

Методи дослідження – біотехнологічні, молекулярно-біологічні, вірусологічні, біохімічні, електрофорез в агарозному гелі, електронна мікроскопія, комп’ютерно-статистичні.

Результати досліджень. Для аналізів відбирали плодові тіла з вираженими симптомами захворювань та без них. За інфікованими грибами спостерігали протягом усіх хвиль плодоношення. Як контроль були плодові тіла печериці двоспорової, які добирали згідно з результатами візуальної оцінки на ураження та електронно-мікроскопічного аналізу в лабораторних умовах [1-3, 5].

Для екстракції вірусних патогенів з печериць застосовували метод целюлозної хроматографії. Для цієї мети відбирали зразки печериць з специфічними симптомами, які виражалися у потемнінні, лізисі міцелію, деформації плодових тіл, водянистості ніжок і шапинок, витягнутості ніжок й відмиранні шапинок, утворенні некрозів та пухлин (енацій) на плодових тілах, побурінні міцелію і плодових тіл, різкі зміні морфології, забарвлениі тканин плодових тіл тощо [1-7, 8]. Виділення

длРНК з плодових тіл грибів проводили за загальноприйнятими методиками [5].

Одним із завдань нашої роботи була оптимізація і модифікація методу виділення, очищення і діагностики дволанцюгових РНК вірусів. Суть, унікальність і практичність методу полягає у виділенні із загальної кількості нуклеїнових кислот, яка притаманна тільки вірусу – длРНК. Метод уперше був запропонований і опублікований у 1979 році і більше, ніж тридцять років набував свого поширення та використання. Його специфіка полягає у виявленні дволанцюгової форми вірусної нуклеїнової кислоти, яка практично відсутня у представників рослинного і тваринного світу, а якщо і виділяють, то являє собою нуклеїнову кислоту вірусного походження.

Способ діагностики та ідентифікації РНК-вмісних фітовірусів (рис. 2) передбачає наступні етапи його проведення: 3,5 г рослинного зразку (уражені ділянки листя, стебел, коренеплодів, насіння тощо) гомогенізувати в буферному розчині STE (0,1M NaCl, 0,05M tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 7,0) в умовах рідкого азоту.

Після проведення гомогенізації проводять фенольне виділення і очищення загальних нуклеїнових кислот та два цикли целюлозного фракціонування, що включають декілька стадій з використанням 16% розчину етанолу.

Фракцію длРНК після целюлозного фільтрату переводять на STE-буфер без етанолу і концентрують в двох об'ємах охолодженого 95% етилового спирту та 0,1 об'єму 0,2M натрій ацетату, pH 5,5.

Проаналізувавши спосіб діагностики та ідентифікації РНК-вмісних фітовірусів, нами виявлено, що запропонована методика виділення для мікроскопічних та їстівних грибів не забезпечує повною мірою чистоту та достатню концентрацію длРНК вірусів.

Запропонований нами спосіб виділення полягає у тому, що за умов використання зразку масою 10 г, який після гомогенізації в умовах рідкого азоту переносять в центрифужні пробірки, додають 12 мл буфера 2x STE (H_2O – 500 мл, NaCl – 29г, tris – 30,5г, EDTA – 1,85г), 1 мл 1% SDS (H_2O – 100 мл, додицилосульфат натрію – 10 г) і 1 мл бентоніту, перемішують на шейкері впродовж 15 хв до утворення однорідної маси. Додавання 17 мл STE-фенолу (H_2O – 500 мл, 2x STE – 500 мл, pH 4,5) та 17 мл розчину хлороформ-ізоамілу (24:1) (центрифугували 20 хв за 2500 об/хв). Після центрифугування відбирають водну фазу і знову центрифугують 10 хв за 8000 об/хв, відбирають надосад з додаванням 1,5 г целюлози і 3 мл абсолютноного етанолу, перемішують впродовж 15–20 хв, надалі зразки переносять на лід на 30 хв за температури – 15° С. Вміст пробірок переливають в колонки, додають буфер STE-OH (STE – 100 мл, етиловий спирт – 174 мл, H_2O – 726 мл) 20 мл та буфер STE – 20 мл. Фільтрати

переливають у центрифужні пробірки та додають 30 мл етилового спирту, центрифугують 30 хв за 8000 об/хв, зливають надосад й підсушують на фільтрувальному папері за температури +18–20° С – 2 год, додають 200 мкл 10Х РНК-буфера (0,35% (w/v) Orange G, 30% (w/v) Ficoll 400, 1 mM EDTA). В отриманий розчин додають 1 мкл MgCl₂ та переносять в термостат на 1 год за температури +37 °С.

Завдяки оптимізації вищеописаного способу, який передбачає збільшення маси наважки вихідного матеріалу до 10 г, об'єму STE буфера (30 мл) для первинної відмивки, додавання 50% від об'єму фенолу, 17 мл хлороформу, 2 мл ізоамілового спирту за умов виділення дволанцюгової вірусної РНК виникає можливість підтвердження ефективності запропонованого способу діагностики і ідентифікації РНК-вмісних вірусів мікроскопічних та юстівних грибів. Застосовуючи спосіб діагностики і ідентифікації РНК-вмісних вірусів мікроскопічних і юстівних грибів, ми забезпечуємо отримання достатньої концентрації длРНК вірусів, в результаті чого можна стверджувати щодо підвищення ефективності наукових досліджень.

Висновки. Ідентифікація фрагментів длРНК фітовірусів є сталою для конкретних представників фіто- і міковірусних патогенів, яка являє собою методи діагностики і ідентифікації РНК-вмісних фітовірусів, стадій їх транспорту переносниками (гриби, комахи, нематоди тощо), а також вивчення відмінностей ізолятів РНК вмісних фіто- та міковірусів.

Вагоме використання модифікована методика може мати для проведення фітосанітарного контролю печеричних комплексів, карантинної служби, української митниці. Отримані результати виділення і ідентифікації длРНК міковірусів в комбінації із класичними методами вірусної діагностики дозволяють вивчати питання локалізації і транспорту вірусу в грибах.

Отже, в результаті аналізу длРНК, які виділені з плодових тіл печериці, установлено наявність вірусної інфекції. На підставі проведених експериментів рекомендовано використовувати наважку вихідного матеріалу 10 г, об'єм STE буфера для первинної відмивки 30 мл, додавання 50% від об'єму фенолу, 17 мл хлороформу і 2 мл ізоамілового спирту. Цей спосіб забезпечує якісне проведення діагностики та ідентифікації РНК-вмісних вірусів у мікроскопічних і юстівних грибах.

Перспективи подальших досліджень. Для інтенсифікації промислового виробництва печериць на безвірусній основі і запобігання розповсюдження міковірусів – рекомендується на ранніх етапах проводити комплексну діагностику міцелію на вірусоносійство з використанням досліджень діагностичних тест-систем на основі ПЛР, що буде темою наступних наших досліджень.

Список літератури

1. Іванова Т. В. Особливості виділення сумарної РНК з плодових тіл печериці двосporової / Т. В. Іванова, І. О. Антіпов, В. В. Оверченко: Матеріали V Міжнародної конференції молодих вчених "Біологія: від молекули до біосфери", м. Харків, 22–25 листопада 2010 р. / М-во освіти і науки України [та ін.]. – Харків: Оперативна поліграфія, 2010. – С. 60–61.

2. Іванова Т. В. Виявлення вірусних хвороб у плодових тілах печериці двоспорової (*Agaricus bisporus (J.Lge) Imbach*) [Електронний ресурс] / Т. В. Іванова // Наукові доповіді НУБіП України – 2011. – № 1(23). – 12 с. – Режим доступу http://www.nbuvgov.ua/e-journals/Nd/2011_7/11tvibsm.pdf

3. Goodin M. M. Characterization of an RNA dependent RNA polymerase activity associated with La France isometric virus. J. / M.M. Goodin, B. Schlagnhaufer, T. Weir, C.P. Romaine // Virol.– 1997.– №71.– P. 2264–2269.

4. Grogan H. M. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of Agaricus bisporus / H. M. Grogan, B. A. Adie, R. H. Gaze [et all.] // Mycol. Res. – 2003.– №107 (2). – P. 147–154.

5. Elibuyuk I. Detection of a virus disease on Agaricus bisporus (white button mushroom) in Ankara, Turkey / I. Elibuyuk, H. Bostan // International journal of agriculture & biology. – 2010. – №12.– P. 597–600.

6. Mills P. R. Final Project Report on Defra project HH2304SMU: Characterisation of дlРНК associated with mushroom Virus X / P. R. Mills, B. Adie, H.M. Grogan // 2002. – 23 p.

7. Gaze R.H. A new virus disease of Agaricus bisporus? / R. H. Gaze, L. Calvo-Bado, M. P. // Challen In Science and cultivation of Edible fungi // Balkema Publishers. – Rotterdam. – 2000.– P. 701–705.

8. Hollings M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom / M. Hollings // Nature – 1962. – №196. – P. 962–968.

9. Maffettone E. Characterization of a novel virus associated with the MVX disease of Agaricus bisporus: Phd thesis for the degree of Doctor of Philosophy / E. Maffettone // – Cranfield University, 2007. – 273 p.

В результате анализа дlРНК, выделенной из плодовых тел шампиньона установлено наличие вирусной инфекции.

Присутствие фрагментов дlРНК вирусного происхождения совпадает с литературными данными о возможности поражения грибов специфическими миковирусами. Можно утверждать эффективность предложенной нами методики идентификации дlРНК, выделенных из плодовых тел шампиньона двуспорового.

Шампиньон двуспоровый, вирусная болезнь, идентификация, дlРНК, диагностика.

Double-stranded RNA isolated from the mushroom. Viral infection is present in mushrooms.

Fragments of viral double-stranded RNA present identical with the data] of lesion-specific fungi mikovirusamy. efficiency is double-stranded RNA zaproponovanoyitmetodyky identification with fruiting bodies of mushrooms.

Mushroom, viral disease, identification, double-stranded RNA diagnostics.