

ДІАГНОСТИКА ТА ПЛР-ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКОВІРУСУ MVX ПЕЧЕРИЦІ ДВОСПОРОВОЇ

Т.В. ІВАНОВА, кандидат сільськогосподарських наук,
М.Д. МЕЛЬНИЧУК, доктор біологічних наук,
І.О. АНТІПОВ, кандидат сільськогосподарських наук,
К.В. ГРИНЧУК, аспірант

*Наведено результати досліджень діагностики та ПЛР-ідентифікації міковірусу MVX печериці двоспорової (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach). З'ясовано особливості інфікування вірусом MVX печериці двоспорової в умовах закритого ґрунту на території Київської області методами візуальної діагностики й електронної мікроскопії.*

Ключові слова: печериця двоспорова, вірус, хвороба, ідентифікація, дЛРНК, електронна мікроскопія.

Нині у світі вирощується близько 35 видів грибів, з них 20 у промислових масштабах [11]. Останнім часом в Україні спостерігається збільшення обсягу виробництва культивованих їстівних грибів. Так, у 2009 р. було вироблено 40 тис. т грибів, що в 26 разів більше, ніж у 2000 році та майже в 2 рази більше, ніж наприклад, у Туреччині [19].

Через нестачу достовірної ринкової інформації і офіційних даних щодо обсягів виробництва грибів в Україні ці цифри умовні. За обсягами виробництва грибів кращими є Київська, Донецька, Дніпропетровська, Одеська, Харківська і Львівська області, в господарствах яких вирощують печериці і гливи [4, 11, 19].

Вченими остаточно доведено, що практично кожній рослині (як і людині, тварині, грибу тощо) притаманні свої специфічні віруси [6]. Віруси було виділено у 73 видів грибів, що належать до 57 родів та п'яти класів. Більшість з них є відносно авірулентними [20].

Останнім часом в результаті застосування спрощених методик діагностики захворювань печериці в господарствах, що їх вирощують, збільшилась кількість випадків виявлення вірусних хвороб і часто з першого дня культивування міцелію [2].

Впродовж останніх 20 років у літературі з'явилися роботи, присвячені вивченню вірусних захворювань печериці і заходів боротьби з ними [1 – 3, 7 – 18]. Найнебезпечнішим серед них є La France (LFIV або LIV), плодових тілах індукується віріоном розміром 35 нм. Цей ізометричний вірус був предметом широких епідеміологічних досліджень і боротьби, тому тепер захворювання La France зустрічається рідко [2, 8, 9 – 11].

У плодових тілах печериці українськими вченими виявлено один з вірусів *A. Bisporus*, який має паличкоподібну форму. Його довжина становить 150 – 295 нм, діаметр — майже 18 нм. Цей патоген знижував урожай грибів впродовж всього циклу збирання в 1,5 – 3 рази.

При застосуванні механічної інокуляції та ін'єкції суспензій з хворого міцелію та плодових тіл, патоген може призвести до патологічних змін навіть у

деяких рослин. У клітинах інокульованих рослин вірус локалізується в цитоплазмі здатний утворювати внутрішньоклітинні включення. Встановлено, що він має антигенну спорідненість з вірусом тютюнової мозаїки [1,2,8].

Після виділення М. Холлінгсом сферичних (близько 25–29 нм) та бацилоподібних за морфологією вірусів (19×50 нм), з'явився ряд повідомлень про те, що печериці уражуються вірусами різної морфології. Умовно їх можна розділити на паличкоподібні, бацилоподібні та сферичні. При цьому паличкоподібний вірус, за даними майже всіх авторів, був розміром близько 270×17 нм, бацилоподібний в основному — 19×50 нм, а сферичний — 25–45 нм. Цікаво, що бацилоподібний вірус за своєю морфологією схожий з вірусом мозаїки люцерни, але не має з ним серологічної спорідненості [2,15].

В умовах природних біоценозів та промислового виробництва грибів в Україні також виділені віруси розміром близько 32 нм, 18×52 нм та 150–295×18 нм. Слід відзначити, що в деяких дослідженнях сферичним та бацилоподібним вірусами не вдавалося інфікувати вищі рослини [2,4,15].

В останні роки вірусні хвороби стали дуже поширеними при промисловому виробництві грибів. Восени 1996 р. в Англії повідомили про зниження врожаю грибів, причини якого не змогли встановити. Симптоми захворювання були відсутні, але грибниці були практично без ознак росту плодових тіл. З 1996 до 2003 року, число постраждалих господарств із подібною етіологією збільшилося. Кілька симптомів відповідали захворюванню на La France, але діагностичні тести для сферичного вірусу показували негативні результати. Останнім часом 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 [9–11,13–15,17].

Було припущено, що цю хворобу індукував неописаний раніше вірус, із характерним длРНК геномом. Його назвали "virus X", а згодом Mushroom Virus X (MVX) [8–10,13].

У 2010 р. кілька господарств Польщі з вирощування грибів, повідомили про незвичайні гриби коричневого кольору, що з'являються на плантаціях печеричних комплексів. Симптоми були дуже подібні до MVX, описаного ірландськими вченими [13,14].

Іноземними авторами було висловлено думку, що побуріння грибів пов'язане не тільки з присутністю MVX, а могло бути спричинене абіотичними факторами. Існують відомості, що бактерія *Pseudomonas* також може призвести до таких "стрес-ефектів" із подібною зміною морфології [14].

Отже, вірусні хвороби не тільки знижують урожай печериць, а й призводять до повної загибелі міцелію. Доведено, що при вірусному захворюванні плодові тіла грибів змінюються морфологічно, втрачаючи при цьому свої смакові якості, мають зменшений термін зберігання і нерідко стають небезпечними для вживання [2,11].

Найбільша небезпека полягає в придбанні неякісного посівного матеріалу, контамінованого вірусами [2]. Такий вірусний міцелій росте повільніше здорового. На сьогодні відомі вірусні хвороби печериць, які можуть уражати плодові тіла як в моновірозах, так і в різних комбінаціях (змішаних вірозах) [6]. Зовнішні симптоми, видимі неозброєним оком на плодових тілах, можуть бути найрізноманітнішими: коричневі довгасті плями на ніжках, водянисті ніжки,

побуріння та всихання шапинок грибів. Деякі симптоми подібні до результатів недостатньої вентиляції або надмірної температури: маленькі шапинки на довгих ніжках, швидкий розрив тканин плодового тіла. Часто вірусні захворювання грибів протікають безсимптомно, призводячи до зменшення врожаю та якості грибів [1,2].

Метою нашого дослідження було розробити високоточні і ефективні діагностичні тест-системи для ідентифікації вірусів печериць, забезпечити експрес-діагностику і, як наслідок, високоточне планування закладки плантацій грибів на безвірусній основі. Це сприятиме своєчасності проведення заходів із запобігання та боротьби з вірусними інфекціями і дозволить виробникам досягти високих результатів при вирощуванні грибів.

Методика досліджень. Для дослідження вірусних патогенів грибів використовували зразки із специфічними симптомами і без них (табл.).

Виявлення вірусних хвороб печериць в Київській області

Зона дослідження (поширення) вірусних хвороб	Зовнішні симптоми ураження плодових тіл	Детекція вірусів методом виділення длРНК	Ураження, %, $M \pm m$
Київська обл., Васильківський р-н, Приватне підприємство	Темно-коричневі плями, водянисті ніжки	+	$8,5 \pm 0,5$
Київська обл., Києво-Святошинський р-н, Приватне підприємство	Відсутні	+	$7,0 \pm 0,3$
Київська обл., м. Васильків, Приватне підприємство	Бурувато-темні плодові тіла	+	$6,3 \pm 0,3$
Виробничий агрокомбінат м. Київ	Бурувато-коричневі плями	+	$1,6 \pm 0,6$

Експериментальна частина роботи виконана упродовж 2006 – 2011 рр. на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фітовірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі дослідження проведено у науково-дослідному відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК, лабораторії виробництва міцелію ДП НДВ агрокомбінат "Пуща-Водиця", на приватних грибних підприємствах м. Києва та області.

Для дослідження вірусних патогенів грибів використовували зразки з специфічними симптомами і без них. При обстеженні плодових тіл печериці двоспорової в грибних господарствах Васильківського, Києво-Святошинського і Макарівського районів Київської області та промислових грибних підприємствах міста Києва в період з 2006 до 2011 рр. відібрано 740 зразків, з яких у 87 виявлено симптоми, характерні для вірусних хвороб. Об'єктами досліджень слугували плодові тіла печериці двоспорової, компост, міцелій, покривельний ґрунт. Для аналізів відбирали плодові тіла з вираженими симптомами захворювань. 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 (рис. 1).



Рис. 1. Побуріння та лізис плодових тіл печериць

Гомогенізовані зразки переносили в центрифужні пробірки, додавали 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 1мл бентоніту, перемішували на шейкері впродовж 15 хв до утворення однорідної маси. Додавали 17 мл STE-фенолу (H_2O — 500 мл, 2x STE — 500 мл, рН 4,5) та 17 мл розчину хлороформ-ізоамілу (24:1) й центрифугували 20 хв при 2500 об/хв. Після центрифугування відібрали водну фазу і знову центрифугували 10 хв при 8000 об/хв [13], відібрали надосад і додавали 1,5 г целюлози, 3 мл абсолютного етанолу, перемішували впродовж 15 – 20 хв. Потім зразки переносили на лід на 30 хв при температурі $-15^{\circ}C$. Вміст пробірок переливали в колонки, додавали буфер STE-ОН (STE — 100 мл, етиловий спирт — 174 мл, H_2O — 726 мл) 20 мл та буфер STE — 20 мл. Фільтрати переливали в центрифужні пробірки та додавали 30 мл етилового спирту, центрифугували 30 хв при 8000 об/хв [13], зливали надосад й підсушували на фільтрувальному папері при температурі плюс $18 - 20^{\circ}C$ — 2 год, додавали 200 мкл 10X РНК-буфера (0,35% (w/v) Orange G, 30% (w/v) Ficoll 400, 1 mM EDTA). В отриманий розчин додавали 1 мкл ДНКазу в присутності 1 мкл $MgCl_2$ й переносили в термостат на 1 год при температурі плюс $37^{\circ}C$.

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот длРНК проводили в 1%-ному агарозному гелі впродовж 30 хв при напрузі $5 - 15$ В/см² (рис. 2). Решту зразків зберігали при температурі мінус $20^{\circ}C$.

Результати дослідження. Під час електрофоретичного розділення ідентифіковано длРНК-фрагмент розміром близько 6 тис. пар нуклеотидних залишків (пнз).

В результаті аналізу длРНК, виділених з плодових тіл печериці та електронної мікроскопії, встановлено наявність вірусної інфекції.

Присутність фрагментів длРНК вірусного походження збігається з літературними даними про можливість ураження грибів специфічними міковірусами. Можна стверджувати ефективність запровадженої методики ідентифікації длРНК виділених із симптомних та, особливо, із безсимптомних плодових тіл печериці двоспорової. Після численних експериментів нами рекомендовано використовувати при аналізі кожного зразка 10 г грибної маси для екстракції длРНК. Отримані нами дані про присутність вірусних длРНК-фрагментів підтверджуються даними електронної мікроскопії (рис. 3).

Для діагностики та ідентифікації невідомих вірусів застосовували метод електронної мікроскопії та зручний і апробований раніше метод виділення і ідентифікації длРНК, що вперше був запропонований ще в кінці 70-х років минулого століття [5,6]. Виділення длРНК з плодових тіл грибів проводили за раніше відомими методиками [6, 9, 13], з певними власними модифікаціями [6, 13].

Для цього брали 10 г зразків плодових тіл печериць подрібнювали та гомогенізували масу із додаванням рідкого азоту у фарфорових ступках.

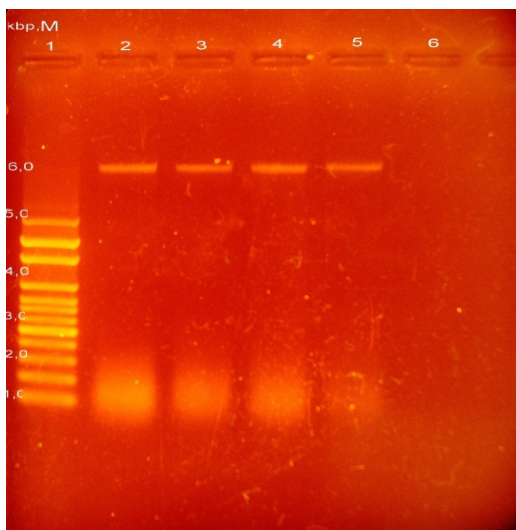


Рис. 2 Електрофореграма (трек 1 — ДНК-маркер (Ladder DNA marker (100 – 5000 bp)), треки 2 – 4 — зразки ізольованих длРНК з плодових тіл печериць, трек 5 — зразок ізольованої длРНК із безсимптомних плодових тіл печериць)

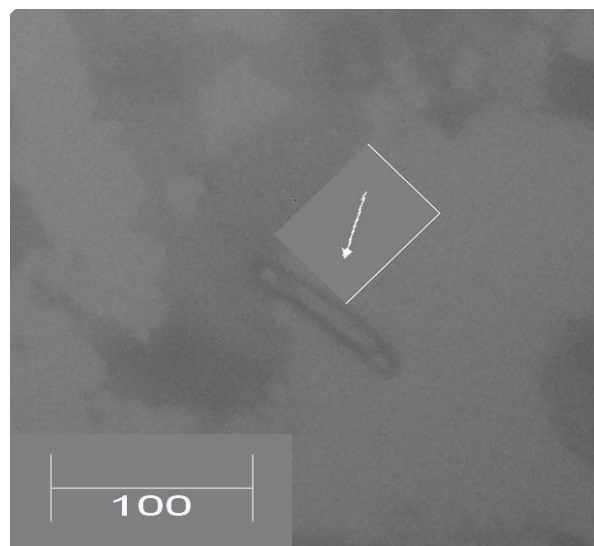


Рис. 3 Електронографія паличкоподібного вірусу в печериці двоспоровій (*Agaricus bisporus* ((J. Lge) Imbach) Bar = 100 nm

Електронно-мікроскопічне дослідження виділеного нативного матеріалу із кожного зразка здійснювали методом негативного контрастування при фіксації препарату 2%-вим розчином фосфорновольфрамової кислоти і переглядали на електронному трансмісійному мікроскопі ЕМВ-3А. Спостерігали тіла паличкоподібної форми розмірами ~ 70 нм.

Виявлені на плодових тілах печериці симптоми у вигляді побуріння та лізису плодових тіл, витягнутості ніжок (рис. 1), дають змогу говорити про вірусну природу їх морфологічних деструкцій. Відмічено присутність длРНК вірусного походження і в безсимптомних зразках грибів.

Висновки. В результаті досліджень з плодових тіл печериці нами виділено длРНК. Дані електронної мікроскопії підтверджують наявність вірусної інфекції.

Виділені фрагменти длРНК збігаються з літературними даними про ураження печериці специфічними міковірусами із родини *Rhabdoviridae*.

Рекомендації виробництву. В результаті проведених досліджень рекомендовано проводити обов'язковий контроль посадкового (маточного) матеріалу грибів (міцелію) на присутність вірусних патогенів. Це рекомендується і для безсимптомних грибів печериці двоспорової, яка в свою чергу може бути вражена вірусами в латентній (безсимптомній) формі. Останнє може стати прихованою причиною для виникнення змішаних інфекцій, коли при інфікуванні вірусом, грибні культури стають чутливими до хвороб, спричинених бактеріями та іншими патогенами, призводячи до втрат врожайності і якості продукції. Апробована система діагностики і ідентифікації длРНК фрагменту розміром близько 6 тис.пнс дозволяє проводити лабораторну експрес-діагностику на виявлення паличкоподібного вірусу печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*) (*J. Lge*) *Imbach*).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бойко О.А. Распространение, диагностика и профилактика болезней шампиньона двуспорового / Бойко О.А., Мельничук М.Д., Иванова Т.В. // Докл. Рос. акад. с. - х. наук. — 2009. — №2. — С. 23 – 24.
2. Бойко О.А. Экология и диагностика вирусных болезней шампиньонов / Бойко О.А. — К.: Фитосоциоцентр, 1999. — 24 с.
3. Девочкин Л.А. Шампиньоны / Л.А.Девочкин— М.: Колос, 1975. — 112 с.
4. Дубиніна А. Розвиток грибівництва в Україні / А.Дубиніна // Харчова і переробна промисловість. — 2009. — № 6 – 7. — С. 8 – 9.
5. Мельничук М.Д. Диагностика та ідентифікація РНК-вмісних фітовірусів на стадії їх біосинтезу шляхом вивчення фізико-хімічних властивостей вірусних дволанцюгових РНК / М.Д. Мельничук, Р.А.Валверді // Доп. НАН України. — 2001. — № 3. — С. 175 – 179.
6. Мельничук М.Д. Фітовірусологія / М.Д.Мельничук Посібник. — К.: ПоліграфКонсалтинг, 2005. — 200 с.
7. Методические указания по иммунодиагностике и профилактике вирусных болезней шампиньона / [И.Б. Каплан, М.Э.Тальянский, К.Л. Алексеева и др.]. — М.:ВАСХНИЛ, 1986. — 22 с.
8. Воуко О. А. Diagnosis and prevention of virus — caused diseases of mushrooms in various ecological niches. / Воуко О. А. Тез. докл. 1-й Международной конференции. Донецк, 1 – 4 октября, 1997. — С.80 – 82.
9. Characterization of an RNA dependent RNA polymerase activity associated with La France isometric virus. J. / [Goodin M.M., Schlagnhauser B., Weir T., Romaine C.P.] // Virology. — 1997. — №71. — P. 2264 – 2269.
10. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus* / [Grogan H.M., Adie B.A., Gaze R.H. et al.] // Mycol. Res. — 2003. — №107 (2). — P. 147 – 154.
11. Elibuyuk I. Detection of a virus disease on *Agaricus bisporus*(white button mushroom) in Ankara, Turkey / Elibuyuk I., Bostan H. // International journal of agriculture & biology. — 2010. — №12. — P. 597 – 600.
12. Hollings M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom / Hollings M. // Nature – 1962. — №196. — P. 962 – 968.
13. MVX disease and double-stranded RNA elements in *Agaricus bisporus* / [Grogan H.M., Holcroft S., Adie B. Et al.] // Mushroom Science. — 2004. — №16. — P. 411 – 420.
14. Pudelko K. Mushroom virus X (MVX): a novel disease of mushrooms in Poland? / Pudelko K.//Journal of plant protection research. — 2010. — Vol. 50, №3. — P.366 – 371.
15. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties / [Fukuhara T., Koga R., Aoki N. et al.] // Archives of Virology. — 2006. — №151. — P. 995 – 1002.
16. Transmission of Mushroom Virus X disease in crops / [Grogan H.M., Tomprefa N., Mulcahy J. Et al.] // Mushroom Science. — 2004. — №16. — P. 489 – 498.
17. Wach M.P. Double-stranded RNA associated with La France disease of the commercial mushroom / Wach M.P., Sriskantha A. and Romaine C.P. // Phytopathology. — 1987. — №77. — P.1321 – 1325.
18. Van Der Lende T.R., Harmsent M.C., Wessels J.G.H. Doublestranded RNAs and proteins associated with the 34 nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. J.//Gen. Virology. — 1994. — №75. — P. 2533 – 2536.

19. <http://www.golosua.com/ekonomika/2010/03/11/> За 9 років виробництво грибів в Україні зросло у 26 разів.
20. http://medbiol.ru/medbiol/sol_vir/ Вирусы: классификации ранние.
21. http://www.nbuu.gov.ua/portal/Chem_Biol/sgmb/2008_7/2008/SM07_17.pdf/ Коломієць Л.П. Характеристики вірусів, що уражують картоплю.

Одержано 30.04.13

Аннотація

Иванова Т.В., Мельничук М.Д., Антипов И.А., Гринчук Е.В.

Диагностика и пир-идентификация миковируса MVX шампиньона двухспорового (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach)

Вьяснено особенності інфікування вірусом MVX шампиньони двухспорового в умовах закритого ґрунту на території Київської області методами візуальної діагностики і електронної мікроскопії. Симптоматика зараження X-вірусом шампиньони проявляється в побуренні плодових тел, потемненні і лизисе мицелія, деформації плодових тел, водянистості ніжок і шляпок, деформації і витянутості ніжок і отмиранні шляпок. Доказана роль і місце данної вірусної інфекції. С допомогою електронної мікроскопії в образцах шампиньони обнаружено X-вірус і зафіксовано тела палочковидной форми размерами ~ 70 нм. Впервые осуществлен вирусологический мониторинг распространенности миковируса MVX в условиях хозяйств Киевской области. С исследуемых 740 образцов, в 87 обнаружены симптомы, характерные для X-вируса шампиньоны. Получено изолированные длРНК, которые идентифицированы и типовано методом ПЦР и изучены их патогенные свойства

В результате анализа длРНК, выделенной из плодовых тел шампиньона установлено наличие вирусной инфекции. На основании проведенных экспериментов рекомендуется использовать навеску исходного материала 10 г, объем STE буфера для первичной отмывки 30 мл, добавление 50% от объема фенола, 17 мл хлороформа и 2 мл изоамилового спирта. Этот способ обеспечивает качественное проведение диагностики и идентификации РНК-содержащих вирусов в микроскопических и съедобных грибах.

Ключевые слова: шампиньон двухспоровый, вирус, болезнь, идентификация, длРНК, электронная микроскопия.

Annotation

Ivanova T.V, Melnychuk M.D., Antipov I.A., Grynychuk E.V.

Diagnosis and PCR identification of mushrooms MVX mikovirus (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach)

The features of infection of mushrooms with MVX virus under the conditions of greenhouses on the territory of Kyiv region with the help of visual diagnostics and electron microscopy methods. Symptoms of infection by X-virus are the browning of mushroom bodies, darkening and lysis of mycelium, deformation of mashrum bodies, aquosity of legs and caps, deformation and elongation of legs and extinction of caps. Proved the role and place of the viral infection. With the help of electron microscopy in the samples of champignon discovered X-Virus and fixed bacillary bodyies of size ~ 70 nm.

Performed virological monitoring of mikovirus MVX prevalence under the conditions of Kiev region. Of the 740 samples studied, in 87 were found the symptoms of champignon X-Virus. Received isolated dsRNK which was identified with PCR method, and the was studied their pathogenic properties.

As a result of the analysis dsRNK selected from champignon bodies of specified the presence of viral infection. On the basis of conducted experiments is recommended to use a sample of 10 g of starting material, the amount of STE buffer for primary washing 30 ml, addition of 50% from volume of phenol, 17 ml of chloroform and 2 ml of isoamyl alcohol. This method provides high-quality of conducting diagnosis and identification of RNA-containing viruses in microscopic and edible mushrooms.

Keywords: champignon bisporus, virus, disease, identification, dsRNK, electron microscopy.