СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІ НАУКИ

УДК606:63:582.284.51
DOI: 10.15587/2313-8416.2015.51517

НОВІ ПІДХОДИ ЕКСТРАКЦІЇ ВІРУСНИХ РНК З ЇСТІВНИХ ГРИБІВ

© Т. В. Іванова, М. Д. Мельничук, Д. Ю. Лопата, В. О. Луцик, І. С. Откидач, В. Л. Степанова, Ю. В. Ященко

Високочутливі експрес тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) шляхом вивчення фізико-хімічних і молекулярних властивостей дозволили якісно ідентифікувати і діагностувати зразки міцелію на присутність патогенів. Розробка молекулярно-діагностичних тест-систем сприяє отриманню вільного від вірусів посівного матеріалу (міцелію) культур грибів і рослин. Досліджуване питання є актуальним для аграріїв та біотехнологів всіх рівнів
Ключові слова: *екстракція, тест-система,печериця двоспорова, вірусна хвороба, дволанцюгова рибонуклеїнова кислота*

The express test systems allow to high quality identify and diagnose the presence of mycelium samples of pathogens, research polymerase chain reaction (PCR) to exploring physical, chemical and molecular properties. Development of molecular diagnostic test systems be contribute receive the seed free from viruses. The experiment is important for agrarians and biotechnologies
Keywords: *extraction, test systems, mushroom, viral disease, double-stranded ribonucleic acid*

1. Вступ

Першочерговою умовою одержання високих врожаїв печериці є отримання і впровадження у виробництво високоякісного посівного матеріалу з високою стійкістю та вільного від патогенів, зокрема, вірусів.

Нині у світі вирощується близько 60 видів грибів, з них 20 у промислових масштабах. Серед них, печериця двоспорова (*Agaricus bisporus)*, на частку якої припадає 35–45 % від загального обсягу виробництва грибів [1, 2].

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

Останніми роками вірусні хвороби стали одними із найшкодочинніших для грибних культур, які призводять до зниження врожайності та якості продукції [1–5]. Для культури *A. Bisporus* описано понад десять патогенних вірусів, для ідентифікації яких практично відсутні високочутливі методи.

Найнебезпечнішим серед них був La France (LFIV або LIV), який в плодових тілах індукується віріоном розміром 35 нм. Цей ізометричний вірус був предметом широких епідеміологічних досліджень і боротьби, тому тепер захворювання LaFrance зустрічається рідко [6]. В останні роки вірусні хвороби стали дуже поширеними при промисловому виробництві грибів.

Англійські вчені наприкінці 90-х років XX століття повідомили про зниження врожаю грибів. Симптоми захворювання були відсутні, але грибниці були практично без ознак росту плодових тіл. 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 LaFrance. Цю хворобу індукував неописаний раніше вірус. Його назвали MushroomVirus X (MVX) [7, 8].

4. Матеріали та методи дослідження

Мета роботи: За мету роботи було обрано адаптація і вдосконалення методики виділення, очищення та ідентифікації вірусних дволанцюгових РНК (длРНК) з культури грибів.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні задачі:

– скринінг зразків печериці на предмет інфікування вірусами;

– адаптація методики виділення, вірусних РНК з культури грибів.

Методи дослідження – молекулярно-біологічні, вірусологічні, електрофорез в агарозному гелі, електронна мікроскопія.

Для аналізів відбирали плодові тіла з вираженими симптомами захворювань. Як контроль були плодові тіла печериці двоспорової, які добирали згідно з результатами електронно-мікроскопічного аналізу в лабораторних умовах. Для ідентифікації і виділення вірусних патогенів з печериць застосовували метод целюлозної хроматографії. Для цієї мети відбирали зразки печериць з специфічними симптомами, які виражались у потемнінні, лізисі міцелію,

деформації плодових тіл, водянистості ніжок і шапинок, витягнутості ніжок й відмиранні шапинок тощо.

5. Результати досліджень

Одним із завдань нашої роботи була оптимізація методу виділення, очищення дволанцюгових РНК вірусів. Суть, унікальність і практичність методу полягає у виділенні із загальної кількості нуклеїнових кислот, яка притаманна тільки вірусу – длРНК. Його специфіка полягає у виявленні дволанцюгової форми вірусної нуклеїнової кислоти, яка практично відсутня у представників рослинного й тваринного світу, а якщо і виділяють, то заодно являє собою нуклеїнову кислоту вірусного походження. 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 0,2М натрій ацетату, pH 5,5. Проаналізувавши спосіб діагностики та ідентифікації РНК-вмісних фітовірусів, нами виявлено, що запропонована методика виділення у випадку для мікроскопічних й їстівних грибів не забезпечує повною мірою чистоту та достатню концентрацію длРНК вірусів.

6. Обговорення результатів

За умов використання проби грибів 10 г отримують зразки, які після гомогенізації переносять в центрифужні пробірки, додають 12 мл буфера 2х STE, 1 мл 1 % SDS і 1мл бентоніту, перемішують на шейкері впродовж 15 хв до утворення однорідної маси. Далі додають 17 мл STE–фенолу та 17 мл розчину хлороформ–ізоамілу (24:1) й центрифугують 20 хв при 2500 об/хв. Після відбирають надосад з додаванням 1,5 г целюлози і 3 мл абсолютного етанолу, перемішують впродовж 15–20 хв, надалі зразки переносять на лід на 30 хв при –15 ºС. Вміст пробірок переливають в колонки, додають буфер STE–ОН 20 мл та буфер STE – 20 мл. Фільтрати перенесять у центрифужні пробірки та додають 30 мл спирту, центрифугують 30 хв при 8000 об/хв, зливають надосад й підсушують за +18–20 ºС – 2 год, додають 200 мкл 10Х РНК–буфера. В розчин додають 1 мкл $MgCl_2$ й переносять в термостат на 1 год за температури +37 ºС.

7. Висновки

Вагоме використання модифікована методика виділення вірусних нуклеїнових кислот 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 й транспорту вірусу в грибах.

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 й ідентифікації РНК-вмісних вірусів у мікроскопічних та їстівних грибах. Завдяки модифікації методу є можливість підтвердити ефективність запропонованого способу екстракції РНК-вмісних вірусів.

Для інтенсифікації промислового виробництва печериць та запобігання розповсюдження міковірусів – рекомендується на ранніх етапах проводити комплексну діагностику міцелію на вірусоносійство.

Література

1. Іванова, Т. В. Особливості виділення сумарної РНК з плодових тіл печериці двоспорової [Текст]: матер. V міжн. конф. молодих вчених / Т. В. Іванова, І. О. Антіпов, В. В. Оверченко // Біологія: від молекули до біосфери. – М-во освіти і науки України. – Харків: Оперативна поліграфія, 2010. – С. 60–61.

2. Іванова, Т. В. Виявлення вірусних хвороб у плодових тілах печериці двоспорової (Agaricusbisporus (J.Lge) lmbach) [Текст] / Т. В. Іванова // «Наукові доповіді НУБіП». – 2011. – № 7 (23). – С. 12. – Режим доступу: http:// nd.nubip.edu.ua/2011-1/11tvibsm.pdf

3. Grogan, H. M. Final Project Reporton Defra project HH2304SMU: Characterisation of dsRNA associated with mushroom Virus X [Text] / P. R. Mills, B. Adie, H. M. Grogan. – 2002. – 23 p.

4. Maffettone, E. Characterization of a novel virus associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus* [Text]*:* Phd thesis ... Doctor of Philosophy / E. Maffettone. – Cranfield University, 2007. – 273 p.

5. Elibuyuk, I. Detectionof a virus disease on Agaricus bisporus(white button mushroom) in Ankara, Turkey [Text] / I. Elibuyuk, H. Bostan // International journal of agriculture & biology. – 2010. – Vol. 12. – P. 597–600.

6. Goodin, M. M. Characterization of an RNA dependent RNA polymerase activity associated with La France isometric virus [Text] / M. M. Goodin, B. Schlagnhaufer, T. Weir, C. P. Romaine // Virol. – 1997. – Vol. 71. – P. 2264–2269.

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

8. Grogan, H. M. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of Agaricus bisporus s [Text] / H. M. Grogan, B. A. T. Adie, R. H. Gaze, M. P. Challen, P. R. Mills // Mycological Research. – 2003. – Vol. 107, Issue 2. – P. 147–154. doi: 10.1017/s0953756203007202

References

1. Ivanova, T. V., Antipov, I. O., Overchenko, V. V. (2010). Osoblyvosti vydilennja sumarnoi' RNK z plodovyh til pecheryci dvosporovoi'. Biologija: vid molekuly do biosfery. Ministerstvo osvity i nauky Ukrai'ny. Kharkiv: Operatyvna poligrafija, 60–61.

2. Ivanova, T. V. (2011). Vyjavlennja virusnyh hvorob u plodovyh tilah pecherycі dvosporovoi' (Agaricusbisporus (J.Lge) lmbach). «Naukovi dopovidi NUBiP»,7 (23), 12. Available at: http://nd.nubip.edu.ua/2011-1/11tvibsm.pdf

3. Grogan, H. M., Adie, B., Grogan, H. M. (2002). Final Project Reporton Defra project HH2304SMU: Characterisation of dsRNA associated with mushroom Virus X, 23.

4. Maffettone, E. (2007). Characterization of a novel virus associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus.* Cranfield University, 273.

5. Elibuyuk, I., Bostan, H. (2010). Detectionof a virus disease on Agaricus bisporus(white button mushroom) in Ankara, Turkey. International journal of agriculture & biology, 12, 597–600.

6. Goodin, M. M., Schlagnhaufer, B., Weir, T., Romaine, C. P. (1997). Characterization of an RNA dependent

RNA polymerase activity associated with La France isometric virus. Virol., 71, 2264–2269.

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

8. Grogan, H. M., Adie, B. A. T., Gaze, R. H., Challen, M. P., Mills, P. R. (2003). Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of Agaricus bisporus. Mycological Research, 107 (2), 147–154. doi: 10.1017/s0953756-203007202

Дата надходження рукопису 21.09.2015

Іванова Тетяна Василівна, кандидат сільськогосподарських наук, Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: tivanova1@ukr.net

Мельничук Максим Дмитрович, доктор біологічних наук, професор, академік НААН України, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: tivanova1@ukr.net

Лопата Дар'я Юріївна, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: dashalopata54@ukr.net

Луцик Вікторія Олександрівна, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування. вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: timosancho@gmail.com

Откидач Ігор Сергійович, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: otkidach-igor@ukr.net

Степанова Вікторія Леонідівна, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: vikulya2507@mail.ru

Ященко Юлія В'ячеславівна, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: ylechka1041995@mail.ru