

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ СВЕКЛЫ, РАСПРОСТРАНЯЮЩИХСЯ ПОЧВЕННЫМ ГРИБОМ *POLYMYXA BETAE*

Ю.Н. Приходько, кандидат сельскохозяйственных наук

Т.С. Живаева

Ю.А. Шнейдер, кандидат биологических наук

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

О.И. Стогниенко, доктор биологических наук

Е.С. Герр

ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свеклы и сахара
имени А.Л. Мазлумова»

e-mail: stogniolga@mail.ru

Аннотация. На основе обзора литературы представлены четыре фитопатогенных вируса свеклы, распространяющихся почвенным грибом *Polymyxa betae* Keskin. Приведены результаты исследований, целью которых являлась отработка серологического и молекулярного методов диагностики *BNYVV*, *BSBV* и *BVQ*. Показаны результаты мониторинга свекловичных полей в областях ЦЧР, подтверждающие наличие *BSBV* и *BBSV*; установлено комплексное поражение растений свеклы вирусами *VtMV*, *BVY* и *BBSV*.

Ключевые слова: почвенный вирус, *Polymyxa betae*, диагностика, сахарная свекла.

Растения сахарной и кормовой свеклы заражают четыре фитопатогенных вируса, распространяющихся почвенным грибом *Polymyxa betae* Keskin: вирус некротического пожелтения жилок свеклы (*BNYVV*), вирус почвенной мозаики свеклы (*BSBMV*), почвенный вирус свеклы (*BSBV*) и вирус Q свеклы (*BVQ*). Наиболее известным из них является *BNYVV*, который является возбудителем болезни мочковатости корнеплодов, или ризомании.

Из европейских стран ризоманию впервые обнаружили в 1947 г. в Италии в долине реки По [1]. В настоящее время, по данным Европейско-средиземноморской организации по защите растений (ЕОЗР), *BNYVV* широко распространен в Австрии, Бельгии, Италии и Турции, ограниченно – в Болгарии, Великобритании, Венгрии, Германии, Дании, Испании, Литве, Нидерландах, Польше, Румынии, Словакии, Словении, Украине, Франции, Хорватии, Чехии, Швейцарии и Швеции. Вирус выявлен также в Греции и Сербии, но в этих странах детальное изучение его распространенности не проводилось. В то же время результаты обследований в

Ирландии, Латвии, Португалии и Финляндии подтверждают его отсутствие.

В азиатском регионе *BNYVV* широко встречается в Иране, ограниченно – в Ливане и Пакистане, выявлен без детального изучения распространенности в Казахстане, Киргизии, Китае, Монголии, Сирии и Японии. На африканском континенте *BNYVV* распространен в Египте, Марокко и ЮАР, а на американском субконтиненте – в Бразилии, США, Сент-Винсенте и Гренадинах.

Почвенный вирус мозаики свеклы (*BSBMV*) хорошо известен в США и пока не выявлен в других странах. Почвенный помовирус свеклы (*Beet soil-borne potovirus* – *BSBV*) был впервые обнаружен в Англии, а затем зарегистрирован в США, Австрии, Бельгии, Венгрии, Испании, Италии, Литве, Нидерландах, США, Швейцарии, Швеции, Франции, Хорватии, Японии, Китае и Иране. Имеется мнение, что в районах выращивания свеклы *BSBV* распространен повсеместно. Близкий к *BSBV* помовирус Q свеклы (*BVQ*) впервые обнаружили в Германии, и длительное время его считали серотипом *BSBV*. Затем его выявляли в Бельгии, Болгарии, Великобритании, Венгрии, Германии, Греции, Испании, Италии, Литве, Нидерландах, Польше, Франции, Хорватии, Чехии, Швеции, то есть в большинстве европейских стран, занимающихся выращиванием сахарной свеклы. Имеется также сообщение о выявлении *BVQ* в Иране [3].

BNYVV и *BSBMV* относятся к роду *Benyvirus* монотипного семейства *Benyviridae*.

Вирионы *BNYVV* имеют палочкообразную форму со спиральной симметрией и центральным каналом диаметром около 20 нм. Для большинства изолятов этого вируса характерно наличие четырех типов ча-

стиц, длина которых составляет 390, 265, 100–105 и 85–90 нм. Геном вируса представляет собой однонитевые плюс-смысловые линейные молекулы РНК. В составе всех изолятов известны 4 молекулы РНК: РНК-1 (6,7 kb), РНК-2 (4,7 kb), РНК-3 (1,8 kb) и РНК-4 (1,5 kb). Каждая молекула РНК энкапсидирована в отдельном вирионе. В геноме некоторых изолятов имеется также РНК-5 величиной 1,45 kb, входящая в состав вирионов длиной около 80 нм. Изоляты вируса, содержащие РНК-5, обнаружены в Японии, Китае, Франции и Казахстане. Установлено, что изоляты BNYVV, содержащие РНК-5, обладают более высокой вирулентностью по сравнению с изолятами, в которых РНК-5 отсутствует [6].

По различиям в последовательности нуклеотидов большинство изолятов BNYVV может быть подразделено на две группы (патотипы) – А и В. Значительно меньше распространен патотип Р. Установлены различия между тремя данными патотипами вируса по патогенности и скорости размножения в растениях различных сортов свеклы [4, 6].

К BNYVV по кругу растений-хозяев, морфологии частиц, организации генома и переносимости *Polymyxa betae* очень близок почвенный бенивирус мозаики свеклы (Beet soil-borne mosaic benyvirus – BSBMV). Однако идентичность последовательности аминокислот в белках оболочки BNYVV и BSBMV составляет всего 56 %, и эти вирусы существенно различаются серологически [10].

Почвенный вирус свеклы (BSBV) и вирус Q свеклы (BVQ) относятся к роду *Potomovirus* семейства *Virgaviridae*. BSBV и BVQ имеют того же переносчика и круг растений-хозяев, что и BNYVV, но отличаются от последнего серологически и структурой генома – наличием всего 3 молекул РНК [7].

BSBV инфицирует лишь корни свеклы и не вызывает каких-либо симптомов на листьях. Проведенные в Германии обследования показали, что BSBV обнаружен на большинстве полей, где встречаются BNYVV и ризомания. В ходе экспериментов было установлено, что BSBV вызывает уменьшение массы корнеплодов сахарной свеклы до 70 %, и его симптомы на них визуально не отличаются от симптомов BNYVV [9].

BSBV и BVQ имеют определенное серологическое родство, поэтому их дифференциация в настоящее время возможна только на основе использования молекулярных методов диагностики [8]. Как правило, BVQ встречается в смешанной инфекции с BSBV и/или BNYVV [11].

Цель исследований состояла в обработке серологического и мо-

лекулярного методов диагностики BNYVV, BSBV и BVQ.

Тест-объектами являлись: референтные изоляты BSBV PV-0676, BVQ PV-0961 и BNYVV PV-0467 из коллекции DSMZ (Германия), изоляты BNYVV, предоставленные Службой карантина растений Украины, и положительные контроли для ИФА к BNYVV, BSBV и BVQ. Изоляты DSMZ и положительные контроли для ИФА представляют собой соответственно лиофилизированные листья и лиофилизированный сок инфицированных растений-индикаторов, хранящиеся при -20 °С. Изоляты BNYVV из Украины представляют собой естественно зараженные корнеплоды сахарной свеклы, хранящиеся при -80 °С.

Для выявления BNYVV были испытаны наборы для ИФА следующих фирм-производителей: Bioreba AG (Швейцария), DSMZ, Loewe Biochemica GmbH (обе – Германия) и Adgen Ltd (Великобритания), а для BSBV – наборы для ИФА фирм DSMZ и Adgen Ltd. Тесты ИФА осуществляли согласно инструкциям фирм-производителей.

Выделение РНК изучаемых вирусов проводили со следующими наборами реагентов для выделения нуклеиновых кислот отечественных производителей: Проба-НК (фирма АгроДиагностика), НК-М-Сорб, Фито-Сорб и М-Сорб-Туб-Автомат (фирма Синтол). Наборы применяли согласно инструкциям фирм-производителей.

Реакцию обратной транскрипции для синтеза первой цепи кДНК BNYVV, BSBV и BVQ проводили со следующими наборами реагентов: Sensiscript RT Kit (Qiagen, Нидерланды), First Strand cDNA Synthesis Kit, Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (оба – фирмы Thermo Scientific, США), MMLV RT Kit (фирмы Евроген, РФ) и набором для обратной транскрипции фирмы АгроДиагностика. Наборы реагентов использовали согласно инструкциям фирм-производителей.

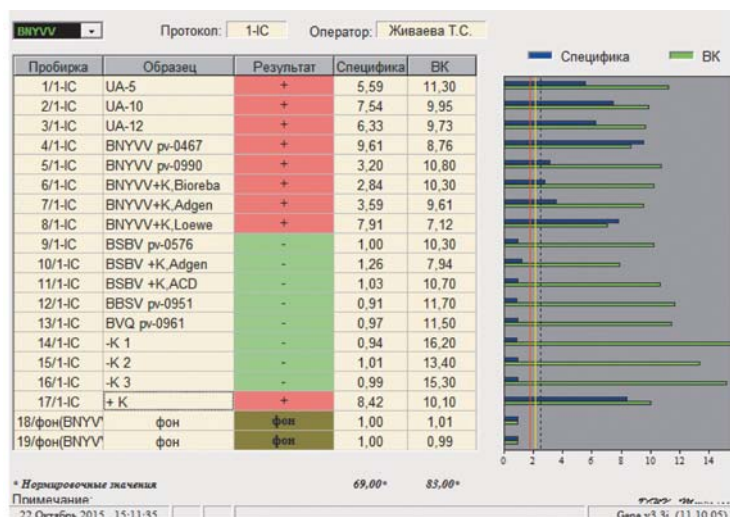
Для отработки диагностики BNYVV методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) было проведено ис-

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных для отработки диагностики BNYVV, BSBV и BVQ методом ПЦР

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Длина продукта п.о.	T _m , °С	Автор
BNYVV-016F	CGA TTG GTA TGA GTG ATT T (A)	500	55	C. Henry et al., 1995
BNYVV-017R	ACT CGG CAT ACT ATT CAC T(T)			
BNYVV-ср-26F	CAT GGA AGG ATA TGT CTC ATAATA GGT T	110	60	V. Harju e.a., 2005
BNYVV-ср-96R	AAC ACT CAC GAC GTC CGA AAC			
BNYVV-ср-56T	FAM-TGA CCG ATC GAT GGG CCC G			
BSBV2for	CTTACGCTGTTCACCTTTTATGCC;	399	63	A. Meunier et al., 2003
SBV2rev	BGTCCGCACTCTTTCAACTGTTC			
BVQ1(1)for	GCTGGAGTATATCACCGATGAC	292	63	A. Meunier et al., 2003
BVQ1(1)rev	AAAATCTCGGATAGCATCCAAC			

Таблица 2. Реакция тест-систем для ИФА к BNYVV и BSBV различных фирм-производителей с изолятами BNYVV, BSBV и BVQ (2012 г.)

Образец	Тест-системы:					
	BNYVV (Adgen)	BNYVV (Bioreba)	BNYVV (DSMZ)	BNYVV (Loewe)	BSBV (Adgen)	BSBV (DSMZ)
Изолят BSBV PV-0676 (DSMZ)	0.047	0.075	0.128	1.117	0.202	0.251
Изолят BVQ PV-0961 (DSMZ)	0.044	0.054	0.114	1.091	0.237	0.208
Изолят BNYVV PV-0467 (DSMZ)	4.033	4.332	1.946	1.213	0.073	0.066
Положительный контроль для ИФА к BNYVV (Bioreba)	3.109	1.782	0.917	0.969	0.072	0.065
Положительный контроль для ИФА к BNYVV (Loewe)	4.295	4.326	1.708	1.239	0.069	0.069
Положительный контроль для ИФА к BNYVV (Adgen)	0.921	0.111	0.366	0.271	0.061	0.153
Изолят BNYVV UA-5 (Украина)	0.195	0.100	0.136	1.194	0.104	0.071
Изолят BNYVV UA-13 (Украина)	0.249	0.105	0.122	0.886	0.089	0.062
Отрицательный контроль для ИФА к BNYVV (Loewe)	0.059	0.071	0.060	1.025	0.117	0.072
Отрицательный контроль для ИФА к BNYVV (Adgen)	0.057	0.062	0.083	1.285	0.120	0.257



а) FLASH-ПЦР с набором к BNYVV фирмы АгроДиагностика

№	Поз.	Тип	Описание	Реактор	Сt FAM	Сt R6G	FAM	R6G
1	A1	ПКО	ПКО	BNYVV	31,67	31,33	+	+
2	A2	ОКО	ОКО	BNYVV	-	32,63	-	+
3	A3	ОКО-в	ОКО-в	BNYVV	-	32,72	-	+
4	A4	ИО	UA-5	BNYVV	34,11	32,16	+	+
5	A5	ИО	UA-10	BNYVV	27,47	31,91	+	+
6	A6	ИО	UA-12	BNYVV	27,18	31,57	+	+
7	A7	ИО	BNYVV pv-0467	BNYVV	16,75	33,34	+	+
8	A8	ИО	BNYVV pv-0990	BNYVV	-	32,92	-	+
9	B1	ИО	BNYVV +K, Bioreba	BNYVV	-	32,45	-	+
10	B2	ИО	BNYVV +K, Adgen	BNYVV	-	31,74	-	+
11	B3	ИО	BNYVV +K, Loewe	BNYVV	20,53	32,72	+	+
12	B4	ИО	BSBV pv-0576	BNYVV	-	32,48	-	+
13	B5	ИО	BSBV +K, Adgen	BNYVV	-	32,46	-	+
14	B6	ИО	BSBV +K, ACD	BNYVV	-	32,47	-	+
15	B7	ИО	BBSV pv-0951	BNYVV	-	32,38	-	+
16	B8	ИО	BVQ pv-0961	BNYVV	-	32,58	-	+
17	C1	ИО	-K, лизирующий буфер	BNYVV	-	32,65	-	+

б) ПЦР-РВ с набором к BNYVV фирмы АгроДиагностика

Рисунок 1. Выявление изолятов BNYVV наборами для FLASH-ПЦР и ПЦР-РВ фирмы АгроДиагностика

пытание набора для FLASN-ПЦР к BNYVV фирмы АгроДиагностика, наборов для ПЦР-РВ к BNYVV – фирм АгроДиагностика и Синтол, а также праймеров BNYVV-ср-26F/BNYVV-ср-96R и зонда BNYVV-ср-56T (V. Harju e.a., 2005).

Наборы реагентов для ПЦР-РВ к BNYVV использовали согласно инструкциям фирм-производителей. Для проведения ПЦР-РВ с праймерами и зондом BNYVV-ср-26F/BNYVV-ср-96R и зонда BNYVV-ср-56T применяли следующие наборы реагентов: qPCRmix-HS (Евроген), 2x Реакционная смесь для ПЦР-РВ (фирма Синтол) и базовый комплект реагентов для ПЦР-РВ № 2 (фирма АгроДиагностика).

Отработку классической ПЦР для выявления BNYVV, BSBV и BVQ проводили с праймерами BNYVV-016 (F)/ BNYVV-017 (R) [5], BSBV 2for/BSBV2rev и BVQ1(1)for/ BVQ1(1)rev [11]. Характеристика всех этих праймеров представлена в таблице 1.

Для постановки классической ПЦР в экспериментах с BNYVV, BSBV и BVQ использовали коммерческий набор реагентов Dream Taq Green PCR Master Mix (фирма Thermo Scientific, США).

Классическую ПЦР проводили на амплификаторах Терцик (фирма ДНК-Технология, РФ), Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) и С1000 Touch 96x0,2 (Bio-Rad, США). ПЦР осуществляли в режиме реального времени на амплификаторах АНК-32 (Синтол, РФ), CFX и IQ-5 (оба – Bio-Rad, США).

Детекцию результатов классической ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Величину продуктов амплификации измеряли, используя маркер молекулярного веса ДНК Gene Ruler 100 bp Plus фирмы Fermentas. Детекцию результатов FLASH-ПЦР проводи-

№	Поз.	Тип	Описание	Реактор	Ct FAM	Ct R6G	Ct Cy5	FAM	R6G	Cy5
1	A1	ПКО	ПКО	BNYVV	29,86	35,61	-	+	?	
2	A2	ОКО	ОКО	BNYVV	-	35,54	-	-	+	
3	A3	ОКО-в	ОКО-в	BNYVV	-	35,55	-	-	?	
4	A4	ИО	UA-5	BNYVV	33,12	-	-	+	-	
5	A5	ИО	UA-10	BNYVV	27,82	36,73	-	+	?	
6	A6	ИО	UA-12	BNYVV	30,12	35,95	-	+	?	
7	A7	ИО	BNYVV pv-0467	BNYVV	23,68	35,68	-	+	?	
8	A8	ИО	BNYVV pv-0990	BNYVV	24,6	35,99	-	+	?	
9	B1	ИО	BNYVV +K, Bioreba	BNYVV	28,68	36,02	-	+	?	
10	B2	ИО	BNYVV +K, Adgen	BNYVV	30,11	38,4	-	+	-	
11	B3	ИО	BNYVV +K, Loewe	BNYVV	27,43	35,69	-	+	?	
12	B4	ИО	BSBV pv-0576	BNYVV	-	35,25	-	-	?	
13	B5	ИО	BSBV +K, Adgen	BNYVV	-	35,62	-	-	?	
14	B6	ИО	BSBV +K, ACD	BNYVV	-	35,77	-	-	?	
15	B7	ИО	BBSV pv-0951	BNYVV	-	35,26	-	-	?	
16	B8	ИО	BVQ pv-0961	BNYVV	-	35,15	-	-	?	
17	C1	ИО	-К, лизирующий буфер	BNYVV	-	35,15	-	-	?	

а) ПЦР-РВ с набором к BNYVV фирмы Синтол

№	Поз.	Тип	Описание	Реактор	Ct FAM	Ct R6G	FAM	R6G
1	A1	ПКО	ПКО	BNYVV	21,41	-	+	
2	A2	ОКО	ОКО	BNYVV	-	-	-	
3	A3	ОКО-в	ОКО-в	BNYVV	-	-	-	
4	A4	ИО	UA-5	BNYVV	31,37	-	+	
5	A5	ИО	UA-10	BNYVV	27,73	-	+	
6	A6	ИО	UA-12	BNYVV	26,19	-	+	
7	A7	ИО	BNYVV pv-0467	BNYVV	17,97	-	+	
8	A8	ИО	BNYVV pv-0990	BNYVV	19,59	-	+	
9	B1	ИО	BNYVV +K, Bioreba	BNYVV	24,25	-	+	
10	B2	ИО	BNYVV +K, Adgen	BNYVV	28,52	-	+	
11	B3	ИО	BNYVV +K, Loewe	BNYVV	21,54	-	+	
12	B4	ИО	BSBV pv-0576	BNYVV	-	-	-	
13	B5	ИО	BSBV +K, Adgen	BNYVV	-	-	-	
14	B6	ИО	BSBV +K, ACD	BNYVV	-	-	-	
15	B7	ИО	BBSV pv-0951	BNYVV	-	-	-	
16	B8	ИО	BVQ pv-0961	BNYVV	-	-	-	
17	C1	ИО	-К	BNYVV	-	-	-	

б) ПЦР-РВ с праймерами и зондом cp-26F/BNYVV-cp-96R/BNYVV-cp-56T

Рисунок 2. Выявление изолятов BNYVV методом ПЦР-РВ с набором фирмы Синтол и праймерами cp-26F/BNYVV-cp-96R/BNYVV-cp-56T

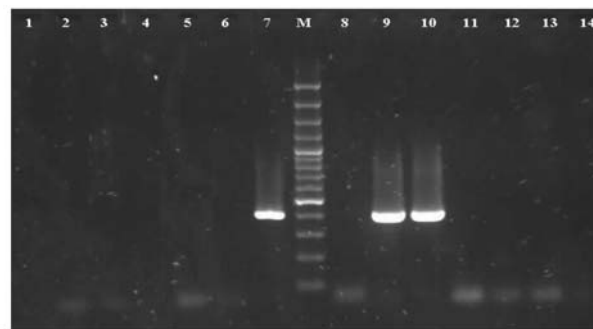
ли на ПЦР-детекторе «Джин» (ДНК-Технология, Россия).

Секвенирование полученных продуктов амплификации выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с рекомендациям производителя.

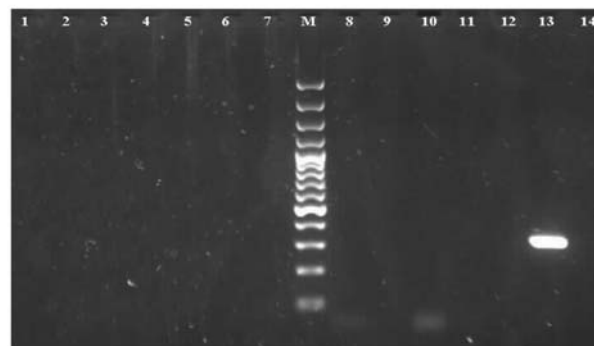
В результате при обработке серологического метода диагностики установлена высокая специфичность наборов для ИФА к BNYVV фирм Adgen Ltd, Bioreba AG и DSMZ: используемые в этих наборах антисыворотки реагировали с изолятами BNYVV PV-0467, UA-5 и UA-13 и со всеми испытанными положительными контролями для ИФА к BNYVV. Одновременно они не реагировали с помовирусами BSBV и BVQ и отрицательными контролями для ИФА. Наиболее высокие значения экстинкции отмечены для набора фир-



а) ОТ-ПЦР на наличие BNYVV с праймерами BNYVV-016F/BNYVV-017R



б) ОТ-ПЦР на наличие BSBV с праймерами BSBV2for/SBV2rev



в) ОТ-ПЦР на наличие BSBV с праймерами BVQ1(1)for/BVQ1(1)rev

Образцы:

- | | | | |
|---|-------------------|----|-----------------------|
| 1 | -К (вода) | 8 | BNYVV +K, Loewe |
| 2 | UA-10 BNYVV | 9 | BSBV PV-0576 |
| 3 | UA-12 BNYVV | 10 | BSBV +K, Adgen |
| 4 | BNYVV PV-0467 | 11 | BSBV +K, ACD |
| 5 | BNYVV PV-0990 | 12 | BBSV PV-0951 |
| 6 | BNYVV +K, Bioreba | 13 | BVQ PV-0961 |
| 7 | BNYVV +K, Adgen | 14 | -К (лизирующий буфер) |

Рисунок 3. Выявление BNYVV, BSBV BVQ методом классической ОТ-ПЦР

мы Adgen Ltd. В то же время, констатирована крайне низкая специфичность антисыворотки к BNYVV, используемой в наборе фирмы Loewe. Эта антисыворотка реагировала как с изолятами BNYVV, так и с

Таблица 3. Выявление вирусов желтухи свеклы (BYV), черного ожога свеклы (BBSV), мозаики свеклы (BtMV) и почвенного вируса свеклы (BSBV) в образцах сахарной свеклы из Воронежской области (ВНИИКР, ИФА 28.09.2020 г.)

№	№ образца по отбору (ВНИИКР)	Образец	BYV (DSMZ)			BSBV (DSMZ)			BBSV (DSMZ)			BtMV (DSMZ)		
			X Ao	Ao/Ak	**	X Ao	Ao/Ak	**	X Ao	Ao/Ak	**	X Ao	Ao/Ak	**
1	1-а	Р- 2, им 3, лист	0,122	1,22	-	0,116	1,40	-	0,122	1,26	-	0,202	2,02	-
2	1-б	Р- 2, им 3, вчк	0,185	1,85	-	0,174	2,10	-	0,171	1,76	-	0,162	1,62	-
3	2-а	Р- 2, им 3, л.	0,139	1,39	-	0,139	1,67	-	0,184	1,90	-	0,209	2,09	-
4	2-б	Р- 2, им 3, вчк	0,185	1,85	-	0,122	1,47	-	0,115	1,19	-	0,150	1,50	-
5	3-а	Р - 2, им3, л.	0,113	1,13	-	0,106	1,28	-	0,093	1,00	-	0,123	1,23	-
6	3-б	Р - 2, им 3, вчк	0,145	1,45	-	0,306	3,69	+	0,142	1,46	-	0,151	1,51	-
7	4-а	Р- 2, им 3, л.	0,140	1,40	-	0,105	1,27	-	0,099	1,02	-	0,149	1,49	-
8	4-б	Р- 2, им 3, вчк	0,107	1,07	-	0,100	1,20	-	0,121	1,25	-	0,125	1,25	-
24	13-а	Р-ЖБ4, л.	0,228	2,28	-	0,140	1,69	-	0,105	1,08	-	0,357	3,57	+
25	13-б	Р-ЖБ4, вчк	0,228	2,28	-	0,070	1,00	-	0,228	2,35	-	0,357	3,57	+
26	14-а	Р-ЖБ4, л.	0,228	2,28	-	0,137	1,65	-	0,188	1,94	-	2,533	25,3	+
27	14-б	Р-ЖБ4, вчк	0,267	2,67	+/-	0,129	1,55	-	0,228	2,35	-	0,609	6,09	+
28	15-а	Р-ЖБ4, л.	0,341	3,41	+	0,082	1,00	-	0,253	2,61	+/-	0,367	3,67	+
29	15-б	Р-ЖБ4, вчк	0,291	2,91	+/-	0,135	1,63	-	0,304	3,13	+	0,384	3,84	+
Отрицательный контроль			0.100			0.083			0.097			0.100		
Положительный контроль			0.277			0.681			4.431			4.916		

Примечание: л.- лист; вчк – верхняя часть корнеплода

изолятами гетерологичных объектов – BSBV и BVQ. Отмечена также сероположительная реакция этой антисыворотки с отрицательными наборами для ИФА. Установлено, что антисыворотки к BSBV фирм Adgen Ltd и DSMZ реагируют с изолятами BSBV и BVQ, а с изолятами BNYVV – нет (табл. 2). Таким образом, они могут быть использованы для специфического выявления BSBV и BVQ, но не позволяют дифференцировать эти серологически близкородственные вирусы до уровня вида.

Проведена валидация наборов для FLASH-ПЦР к BNYVV фирмы Агродиагностика, наборов для ПЦР-РВ к BNYVV фирм Агродиагностика и Синтол, а также праймеров и зонд BNYVV-ср-26F/ BNYVV-ср-96R/ BNYVV-ср-56T (V.Narju e.a., 2005), рекомендованных в диагностическом протоколе ЕОКЗР для выявления BNYVV методом ПЦР-РВ [2].

При испытании набора для FLASH-ПЦР к BNYVV не отмечено неспецифической реакции с изолятами других почвенных вирусов свеклы – помовируса Q свеклы (BVQ) и некровируса черного ожога свеклы (BBSV), но была выявлена нестабильная неспецифическая реакция с изолятом почвенного помовируса свеклы (BSBV) (рис. 1а).

Констатирована высокая специфичность к BNYVV наборов для ПЦР-РВ фирм Агродиагностика и Синтол, а также праймеров и зонда BNYVV-ср-26F/ BNYVV-ср-96R/ BNYVV-ср-56T, которые не реагировали с изолятами нецелевых объектов BVQ, BBSV и

BSBV (рис. 1б, рис. 2). В то же время, установлено, что набор для ПЦР-РВ фирмы Агродиагностика не позволял диагностировать все испытываемые изоляты этого вируса. Результаты не зависели от используемого набора реагентов для обратной транскрипции.

Установлено, что в зависимости от используемого изолята, набор для FLASH-ПЦР к BNYVV позволяет диагностировать этот вирус при разведении инфекционного сока до 10^{-7} – 10^{-8} . Чувствительность тестов с наборами для ПЦР-РВ фирм Агродиагностика и Синтол составляет соответственно 10^{-8} и 10^{-5} , а с праймерами и зондом BNYVV-ср-26F/BNYVV-ср-96R/BNYVV-ср-56T – 10^{-6} – 10^{-7} .

Со всеми вышеперечисленными тест-системами для ПЦР-РВ отработана технология иммуноспецифической ПЦР с использованием иммуноглобулинов к BNYVV фирмы Adgen, что позволяет отказаться от трудоемкой операции по выделению нуклеиновых кислот.

Проведена отработка классической ОТ-ПЦР для выявления BNYVV, BSBV и BVQ с использованием праймеров BNYVV-016F/ BNYVV-017R [5], BSBV2for/ SBV2rev и BVQ1(1)for/BVQ1(1)rev [11].

Констатирована высокая специфичность этих праймеров к целевым объектам (рис. 3). Установлено, что положительный контроль для ИФА к BNYVV фирмы Adgen представляет собой смесь изолятов BNYVV и BSBV (рис. 3б), что было подтверждено последующим секвенированием продуктов амплификации.

Определен оптимальный формат проведения классической ОТ-ПЦР с данными праймерами, предусматривающий выделение РНК набором реагентов Проба-НК (Агродиагностика), синтез кДНК набором реагентов MMLV RT kit (Евроген) с праймерами Random dN10 + Oligo dT17 и проведение ПЦР с набором реагентов Dream TaqGreen PCR Master Mix (Thermo Scientific).

Установлено, что выявление BNYVV методом классической ПЦР с праймерами BNYVV-016F/BNYVV-017R достигается при разведении инфекционного сока до 10^{-5} . Определена также принципиальная возможность обнаружения BNYVV методом иммуноспецифической ОТ-ПЦР с использованием специфических иммуноглобулинов фирмы Adgen и праймеров BNYVV-016F/BNYVV-017R.

В 2020–2021 гг. в ряде хозяйств Воронежской и Липецкой областей был проведен серомониторинг насаждений сахарной свеклы на наличие BNYVV, BSBV и некротического вируса свеклы (BBSV) с тестированием 37 отобранных образцов (табл.3). Были выявлены образцы с сероположительной реакцией к BSBV и BBSV, тогда как BNYVV не обнаружен. Вирус некроза свеклы (BBSV) диагностирован в верхней части корнеплода и выявлен с частотой встречаемости 14 %, почвенный вирус свеклы (BSBV) – в листьях и верхней части корнеплода с частотой встречаемости 14 % среди растений с симптомами желтухи листьев. В 2020 г. установлено комплексное поражение одного растения тремя вирусами: мозаикой (BtMV), вирусной желтухой (BYV) и почвенным вирусом (BBSV) с частотой встречаемости 14 %. В 2022 г. планируется проведение подтверждающих тестов на наличие BSBV и BBSV в этих образцах методом ПЦР.

Таким образом, для диагностики вируса некротического пожелтения жилок свеклы (BNYVV) проведена отработка методов иммуноферментного анализа (ИФА) и ПЦР в реальном времени в качестве скрининговых тестов и метода классической ПЦР в качестве подтверждающего теста. Для почвенного вируса свеклы (BSBV) и вируса Q свеклы (BVQ) отработан универсальный тест методом ИФА и дифференцирующие тесты методом классической ПЦР.

Проведенный мониторинг свекловичных полей в областях ЦЧР подтверждает наличие BSBV, BBSV, а также комплексное поражение вирусами (BtMV, BYV, BBSV).

Список литературы

1. Canova, A. On the pathology of sugar beet / A. Canova // *Informatore Fitopatologico*. - 1959. - Vol. 9. - P. 390-396.
2. EPPO, 2006. Beet necrotic yellow vein virus (benyvirus). Diagnostic protocol PM 7/30 (2) // *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. - 2006. - Vol. 36. - P. 429-440.
3. EPPO, 2021. EPPO Global Database / www.cabi.org.
4. Heijbroek, W. Variation in pathogenicity and multiplication of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar beet cultivars / W. Heijbroek, P.M.S. Musters, A.H.L. Schoone // *European Journal of Plant Pathology*. - 1999. - Vol. 105. - P. 397-405.
5. Henry, C.M. Detection of Beet necrotic yellow vein virus using reverse transcription and polymerase chain reaction / C.M. Henry, I. Barker, J. Morris, S.A. Hugo // *Journal of Virological Methods*. - 1995. - Vol. 54. - P. 15-28.
6. Koenig, R. Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan / R. Koenig, B.L. Lennfors // *Archives of Virology*. - 2000. - Vol. 145. - P. 1561-1570.
7. Koenig, R. Beet soil-borne virus RNA2: similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses / R. Koenig, U. Commandeur, S. Loss, C. Beier, A. Kaufmann, D.-E. Lesemann // *Journal of General Virology*. - 1997. - Vol. 78. - P. 469-477.
8. Koenig, R. Genome properties of Beet virus Q, a new furo-like virus from sugar beet, determined from unpurified virus / R. Koenig, C. Pleij, C. Beier, U. Commandeur // *J. General Virology*. - 1998. - Vol. 79. - P. 2027-2036.
9. Koenig, R. Structure and variability of the 3' end of RNA 3 of Beet soil-borne Pomovirus – a virus with uncertain pathogenic effects / R. Koenig, C.W.A. Pleij, G. Büttner // *Archives of Virology*. - 2000. - Vol. 145. - P. 1173-1181.
10. Lee, L. Complete nucleotide sequence and genome organization of Beet soilborne mosaic virus, a proposed member of the genus Benyvirus / L. Lee, E.B. Telford, J.S. Batten, K.B.G. Scholtkof, C.M. Rush // *Arch. Virol.* - 2001. - Vol. 146. - P. 2443-2453.
11. Meunier, A. Multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of Beet necrotic yellow vein virus, Beet soil borne virus, Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet / A. Meunier, J-F. Schmit, A. Stas, N. Kutluk, C. Bragard // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - Vol. 69. - P. 2356-2360.

Diagnostic methods of beet root soil viruses spread by the soil fungus *Polymyxa betae*

Yu.N. Prikhodko, T.S. Zhivaeva, Yu.A. Schneider, O.I. Stognienko, E.S. Gerr

Summary. Based on a review four phytopathogenic beet viruses spread by the soil fungus *Polymyxa betae* Keskin were given. The analysis of studies aimed at testing serological and molecular diagnostic methods of BNYVV, BSBV and BVQ is presented. The results of monitoring of beet fields in the regions of the Central Black-Earth Region are shown, confirming the presence of BSV, BBSV; complex damage by viruses (BtMV, BYV, BBSV) has been established.

Key words: soil virus, *Polymyxa betae*, diagnostics, sugar beet.