

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ШТРИХОВАТОЙ МОЗАИКИ ЯЧМЕНЯ (BSMV)

Т.С. Живаева

Ю.Н. Приходько, кандидат сельскохозяйственных наук

Ю.А. Шнейдер, кандидат биологических наук

Е.В. Каримова, кандидат биологических наук

Н.А. Хорина

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

Аннотация. Рассмотрены характеристика и симптомы вируса штриховатой мозаики ячменя (BSMV). Целью исследований являлась разработка молекулярных методов диагностики BSMV, основанных на использовании полимеразной цепной реакции. В задачи входили отработка методик выделения РНК вируса из растительных образцов и синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) BSMV, испытание и валидация наборов для ПЦР в реальном времени отечественных фирм-производителей, разработка и испытание диагностических праймеров к различным участкам генома вируса. Разработана технология эффективного выявления и идентификации BSMV, предполагающая использование скрининговых (предварительных) и подтверждающих тестов. Рекомендовано в качестве скрининговых тестов использовать метод ИФА с тест-системой к BSMV фирмы «Loewe» (Германия) или метод ПЦР в реальном времени с наборами реагентов для ОТ-ПЦР-РВ к BSMV фирм «АгроДиагностика» или «Синтол». В качестве подтверждающих тестов предложено использовать двухэтапную классическую ПЦР в формате «Форез» или двухэтапную SYBR Green ОТ-ПЦР в реальном времени с разработанными праймерами BSMV α -P8F/BSMV α -P8R, BSMV β -P4F/BSMV β -P4R или BSMV γ -P5F/BSMV γ -P5R.

Ключевые слова: вирус штриховатой мозаики ячменя, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, праймеры.

Введение. Россия традиционно является одним ведущих мировых экспортеров зерновых культур. В фитосанитарных требованиях подавляющего большинства стран-импортеров содержится положение об отсутствии в партиях зерна вируса штриховатой мозаики ячменя (BSMV), что обуславливает необходимость предэкспортных лабораторных исследований.

Вирус штриховатой мозаики ячменя (Barley stripe mosaic virus, BSMV) является типовым представителем рода *Hordeivirus* семейства *Virgaviridae*. Впервые описан в 1951 г. в США [8], но симптомы вызываемой этим вирусом полосчатой мозаики были известны задолго до этого. Коллективом авторов [9] было проведено тестирование методом ОТ-ПЦР на наличие BSMV образцов семян ячменя, обнаруженных при археологических раскопках в Каср-Ибриме на юге современного Египта. Вирус выявлен только в образцах семян ячменя позднехристианского археологического слоя, возраст которых составляет 600–900 лет. Предполагается, что BSMV существовал не менее 10000 лет назад в древних земледельческих районах Месопотамии и дельты Нила, откуда затем произошло его распространение в верховья реки Нил. В позднесредневековый период «Шелкового пути» BSMV перешел в Азию, во время промышленной революции в конце XIX века – в Европу и США, а в послевоенный период развития интенсивного земледелия – распространился по всему миру [9]. В настоящее время с использованием современных методов диагностики наличие BSMV установлено для 15 стран Европы, 10 стран Азии, 6 стран Америки, 4 стран Африки, а также для Австралии и Новой Зеландии [6].

В России вирус штриховатой мозаики ячменя впервые обнаружен в 1961 г. на посевах ячменя в Московской области [1], в дальнейшем – в Барнаульской, Ленинградской, Оренбургской, Самарской, Свердловской, Тамбовской, Ульяновской областях и Краснодарском крае [2, 3]. В Приморском крае ежегодная зараженность им посевов ячменя варьирует от 14,3 до 41,6 %, овса – от 8,3 до 21,4 %, пшеницы – от 16,7 до 59,0 % [7].

Основными растениями-хозяевами BSMV явля-

ются ячмень (*Hordeum vulgare*) и пшеница (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*), реже встречается на овсе (*Avena sativa*) [6]. В Приморском крае BSMV идентифицирован в качестве возбудителя хлоротической полосатости кукурузы, что является первым случаем выявления этого вируса на данной культуре [4, 7]. Там же он обнаружен на растениях пырея ползучего (*Elytrigia repens*) и щетинника низкого (*Setaria pumila*) [7]. В экспериментальных условиях вирус заражает также овсюг (*Avena fatua*), рожь (*Secale cereale*), рис (*Oryza sativa*), сорго (*Sorghum bicolor*), просо (*Panicum miliaceum*), шпинат (*Spinacia oleracea*), свеклу (*Beta vulgaris*), табак (*Nicotiana tabacum*) и несколько видов растений рода *Chenopodium* (*C. album*, *C. giganteum*, *C. quinoa*) [6].

Частицы BSMV представляют собой жесткие палочковидные вирионы диаметром около 20 нм и длиной от 100 до 150 нм в зависимости от размера инкапсулируемой РНК. Молекулярная масса наиболее крупных вирусных частиц составляет около 26 кДа, при этом единственный белок оболочки имеет молекулярную массу около 22 кДа. У вирионов BSMV отчетливо просматривается осевой канал диаметром около 3–4 нм и спиральная структура с шагом спирали 2,5–2,6 нм.

Геном BSMV, как и у других представителей рода *Hordeivirus*, состоит из 3 молекул однонитевой РНК, имеющих название α , β и γ . Величина РНК α , РНК β и РНК γ составляет соответственно 3,8; 3,3 и 3,2 тысяч пар оснований. Части генома упакованы в отдельные вирусные частицы. Все 3 геномные РНК необходимы для заражения растения. Геномные РНК BSMV кодируют 7 основных белков. Белки $\alpha\alpha$ (метилтрансферазная/хеликазная субъединица репликазы), $\beta\alpha$ (белок оболочки) и $\gamma\alpha$ (полимеразная субъединица репликазы) транслируются непосредственно с геномной РНК. Экспрессия белков ТГВ (транспортные белки, кодируемые тройным блоком генов) опосредована двумя субгеномными РНК с названиями sgРНК β 1 и sgРНК β 2.

Несмотря на многолетнее изучение, естественные природные переносчики вируса штриховатой мозаики ячменя не были обнаружены, но благодаря эффективной контактной передаче вирус быстро распространяется в поле от растения к растению, а также через зараженные семена. Семенная инфекция BSMV на ячмене была впервые установлена в 1954 г. и затем неоднократно подтверждалась. Сообщалось также о переносе BSMV с семенами пшеницы, овса и овсюга [5, 6]. BSMV способен длительное время сохраняться в пораженных зерновках. В частности, установлено, что хранение инфицированных семян в течение 5–8 лет не оказывало существенного влияния на ин-

фекционность вируса. Фитопатоген распространяется и с пыльцой зараженных растений. Заражение пыльцевых зерен варьирует от 10 до 35 %. Этот способ может обеспечить заражение растений, произрастающих на некотором удалении от очага вируса [6].

На листьях зараженных растений BSMV вызывает так называемую штриховатую мозаику в виде параллельных светло-зеленых полос, идущих вдоль жилок листа от основания к его вершине, несколько варьируя по ширине и постоянно прерываясь. Часто мозаичный рисунок имеет форму прямой или перевернутой буквы V. Этот признак отличает симптомы BSMV от симптомов всех других вирусных болезней злаков. Интенсивность развития симптомов зависит от штамма вируса, сорта растения-хозяина и климатических условий. Пораженные растения отстают в росте, имеют укороченные стебли и колосья, уменьшается число зерен в колосе, зерновки становятся щуплыми и мелкими, наблюдается стерильность цветков. Симптомы BSMV напоминают поражение гельминтоспориозом, вызываемым грибом *Pyrenophora graminea* Ito & Kuribayashi [6]. В некоторых случаях симптомы можно легко спутать с симптомами других вирусов, заражающих растения пшеницы и ячменя: вирусы слабой мозаики ячменя (Barley mild mosaic virus, BaMMV), желтой мозаики ячменя (Barley yellow mosaic virus, BaYMV), желтой карликовости ячменя (Barley yellow dwarf virus, BYDV), веретеновидной полосатой мозаики пшеницы (Wheat spindle streak mosaic virus, WSSMV), почвенного вируса мозаики пшеницы (Soil-borne wheat mosaic virus, SBWMV), мозаики костра (Brome mosaic virus, BMV). Поэтому визуальная диагностика заболеваний

Таблица 1. Специфические праймеры к различным участкам генома BSMV, разработанные в НМОВБ ВНИИКР

Объект к	Название праймеров	5' – 3' последовательность	T _m , °C	bp
BSMV (к РНК α)	BSMV α –P1F	CCATCGTCGATTCCGTGGAT	60	853
	BSMV α –P1R	CCTCGCATTTGCATCAGCTC		
BSMV (к РНК α)	BSMV α – P8F	ACGAACTGCGTGAGAAGGAG	60	176
	BSMV α –P8R	TGGGCTACGAGGTCTACACA		
BSMV (к РНК β)	BSMV β - P1F	TCGGGGATGTAGCTCAAGGA	60	268
	BSMV β - P1R	GCACAATCGTACCCGCAATC		
BSMV (к РНК β)	BSMV β - P4F	CAAGGAAAAGCCACCACTGC	60	263
	BSMV β - P4R	ATTGCCAGGGCACAATCGTA		
BSMV (к РНК β)	BSMV β - P5F	GCAGGTGCTAGAGGACAAAT	60	976
	BSMV β – P5R	TCACAGACTTGGGCGTCTTC		
BSMV (к РНК γ)	BSMV γ – P5F	CAACGATGCACTCACGCAAA	60	241
	BSMV γ – P5R	TCTGGCATTGCTGTCCTCAG		
BSMV (к РНК γ)	BSMV γ – P10F	GAAAGTGTGCTGGCCTTTTCG	60	953
	BSMV γ – P10R	GCCGCATCTGGAACAAACTG		

на зерновых культурах имеет предварительный характер, а идентификация вирусов возможна лишь с использованием серологических и молекулярных методов диагностики.

Согласно литературным данным, потери урожая зерна в результате заражения BSMV могут составить 16–27, а в отдельных случаях – 30–50 % (ЕРРО, 1983). Полевые опыты в Германии и Уэльсе показали возможность снижения урожайности зараженных растений ячменя на 60 %, а пшеницы – 40–75 % [6]. Заражение кукурузы на ранних стадиях развития (до стадии вытягивания и трубкования стебля) приводит к гибели до 17 % растений, а у выживших – снижается количество и масса зерен, в некоторых случаях наблюдается почти полная недоразвитость початка, в результате потери урожая могут достигать 30–60 % [4, 7].

В настоящее время для выявления BSMV в образцах зерна и вегетативных частей растений преимущественно используют метод обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в различных модификациях и метод иммуноферментного анализа (ИФА). Общепринятым критерием для объективной идентификации вируса является последовательное использование двух различных методов диагностики (ИФА и ОТ-ПЦР) или проведение двух последовательных тестов методом ОТ-ПЦР с праймерами к различным участкам генома этого вируса.

Таблица 2. Оценка специфичности тест-системы для ИФА к BSMV фирмы «Loewe» (Германия)

№ обр.	Образец	BSMV (Loewe)		
		X Ao	Ao/Ak	*
1	MDMV PC-0802, DSMZ	0,039	1,00	-
2	MDMV, +K, Loewe PC-07059	0,050	1,22	-
3	SCMV PC-0731, DSMZ	0,045	1,10	-
4	SCMV, +K, Loewe PC- 07088	0,036	1,00	-
5	MCMV, PC-1087, DSMZ	0,043	1,05	-
6	SrMV, PC- 0801, DSMZ	0,046	1,12	-
7	BMV, PV- 0194, DSMZ	0,053	1,29	-
8	BMV, +K, Loewe, PC-07016	0,044	1,07	-
9	BSMV, +K, Loewe, PC-07004	0,381	9,29	+
10	BYDV, +K, Loewe, PC-07005	0,055	1,34	-
11	BStMV, +K, Loewe, PC-07123	0,051	1,24	-
12	WDV, +K, Loewe, PC-07082	0,049	1,20	-
13	BYMV, +K, Loewe, PC-07007	0,066	1,61	-
14	WSMV, +K, Loewe, PC-07048	0,049	1,20	-
15	WSSMV, +K, Loewe, PC-07171	0,045	1,10	-
16	BaMMV, +K, Loewe, PC-07006	0,075	1,83	-
	Отрицательный контроль	0,041		
	Положительный контроль	0,422		

*Заключение о наличии вируса: - вирус отсутствует; + вирус присутствует

Метод ИФА характеризуется высокой технологичностью и в большей степени адаптирован для одно-временного тестирования большого количества образцов, чем метод ПЦР. Однако чувствительность метода ИФА довольно существенно уступает таковой у метода ПЦР, что имеет немаловажное значение при тестировании образцов зерна. Специфичность антител к BSMV в различных тест-системах для ИФА может существенно варьировать, что обуславливает необходимость их предварительной детальной валидации. Кроме того, отечественные тест-системы для ИФА к BSMV отсутствуют, что означает зависимость от поставок зарубежных фирм-производителей.

Исследования BSMV в нашей стране проводили лишь с помощью методов растений-индикаторов и иммуноферментного анализа, тогда как метод ОТ-ПЦР не использовался из-за недостаточной разработанности.

В связи с этим целью наших исследований являлась разработка молекулярных методов диагностики вируса штриховатой мозаики ячменя BSMV, основанных на использовании ПЦР. В задачи входили отработка методик выделения РНК BSMV из растительных образцов и синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) BSMV, испытание и валидация наборов для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) к BSMV отечественных компаний «АгроДиагностика» и «Синтол», разработка и испытание диагностических праймеров к различным участкам генома этого вируса.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили в 2021–2022 гг. в научно-методическом отделе вирусологии и бактериологии ФГБУ ВНИИКР. Объектами изучения являлись референтные изоляты вируса штриховатой мозаики ячменя (BSMV) PC-0330 (DSMZ) и 07004 PC (Loewe).

В экспериментах по оценке специфичности испытуемых тест-систем и праймеров использовали также референтные изоляты других вирусов, заражающих зерновые культуры: лютеовируса желтой карликовости ячменя (BaYDV), бимовируса слабой мозаики ячменя (BaMMV), бимовируса желтой мозаики ячменя (BYMV), бимовируса веретеновидной полосатой мозаики пшеницы (WSSMV), бромовируса мозаики ковра (BMV), тритимовируса полосатой мозаики пшеницы (WSMV), тритимовируса штриховатой мозаики ковра (BStMV), мастреввируса карликовости пшеницы (WDV), почвообитающий фурувирус мозаики пшеницы (SBWMV), почвообитающий фурувирус мозаики зерновых (SBCMV), потивируса мозаичной карликовости кукурузы (MDMV), потивируса мозаики сахарного тростника (SCMV), потивируса мозаики сорго (SrMV) и махломовируса хлоротической крапчатости кукурузы (MCMV). Изоляты этих вирусов были приобретены в Германской коллекции фитопатогенов (DSMZ) и фирме «Loewe» (Германия).

Серологические тесты проводили с тест-системой для ИФА к BSMV компании «Loewe» в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Выделение РНК BSMV из изолятов вирусов и тестируемых растений для последующего проведения ОТ-ПЦР осуществляли с наборами реагентов Проба-НК (АгроДиагностика) и ФитоСорб (Синтол) по инструкциям фирм-производителей.

Для проведения ОТ-ПЦР в одноэтапном формате использовали специализированный набор реагентов OneTube RT-PCRmix (Евроген, РФ), содержащий в своем составе ревертазу MMLV; в двухэтапном формате – предварительный синтез кДНК обрабатывали с использованием наборов реагентов для обратной транскрипции: MMLV RT Kit (Евроген), Easy-RT (Диалат, РФ), ОТ (Синтол) и с набором реагентов для обратной транскрипции фирмы «АгроДиагностика».

Для проведения классической ПЦР испытывали наборы реагентов: Screen Mix-HS (Евроген), 5x Mas^{DD} Mix-2025 (Диалат), OneTube RT-PCRmix (Евроген). ПЦР в реальном времени в присутствии красителей SYBR Green и EVA Green обрабатывали с наборами реагентов One Tube RT-PCR SYBR (Евроген), qPCR mix-HS +SYBR (Евроген), 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии EVA Green (Синтол). При испытании наборов реагентов для ПЦР-РВ к BSMV фирм «АгроДиагностика» и «Синтол» тесты проводили по прилагаемым инструкциям, а при испытании набора реагентов для ПЦР-РВ к BSMV (АгроДиагностика) выполняли предварительный синтез кДНК BSMV с использованием набора реагентов для обратной транскрипции (АгроДиагностика) и набора MMLV RT Kit (Евроген).

Для разработки праймеров были использованы опубликованные в базе данных NCBI нуклеотидные последовательности BSMV. Было разработано и испытано шесть пар диагностических праймеров к различным участкам генома BSMV (табл. 1). Определение нуклеотидных последовательностей у полученных продуктов амплификации проводили методом секвенирования по Сэнгеру. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программного обеспечения MEGA7.

Результаты исследований и их обсуждение. Специфичность тест-системы для ИФА к BSMV фирмы «Loewe» оценивали по отношению к 16 изолятам 13 вирусов, заражающих зерновые культуры. В результате исследований показана высокая специфичность изучаемой тест-системы. Сероположительный сигнал наблюдался лишь для изолята целевого объекта (BSMV PC-07004). Не отмечено перекрестной реакции с изолятами нецелевых вирусов MDMV, SCMV,

Рисунок 1. Определение аналитической специфичности праймеров BSMV-P8F/BSMV-P8R (НМОВБ ВНИИКР) с использованием двухэтапного формата SYBR Green ОТ-ПЦР-РВ

Лунка	Флуор.	Проба	Cq	Среднее Cq	Стандартное отклонение Cq
A01	SYBR	MDMV pc-0802/A	H/O	0,00	0,000
A02	SYBR	MDMV 07059PC/A	H/O	0,00	0,000
A03	SYBR	SCMV pc-0731/A	H/O	0,00	0,000
A04	SYBR	SCMV 07088PC/A	H/O	0,00	0,000
A05	SYBR	BCMV pv-0411/A	H/O	0,00	0,000
A06	SYBR	BSMV pc-0330/A	22,99	22,99	0,000
A07	SYBR	BSMV 07004PC/A	17,02	17,02	0,000
A08	SYBR	BaMMV pc-0329/A	H/O	0,00	0,000
A09	SYBR	BMV pv-0178/A	H/O	0,00	0,000
A10	SYBR	BMV pv-0194/A	H/O	0,00	0,000
A11	SYBR	BMV 07016/A	H/O	0,00	0,000
A12	SYBR	WSSMVpc-0541/A	H/O	0,00	0,000
B01	SYBR	WSSMV 07171/A	H/O	0,00	0,000
B02	SYBR	WSMV pc-0356/A	H/O	0,00	0,000
B03	SYBR	WSMV 07048/A	H/O	0,00	0,000
B04	SYBR	WDV pc-0840/A	H/O	0,00	0,000
B05	SYBR	WDV 07082/A	H/O	0,00	0,000
B06	SYBR	BYMV 07007PC/A	H/O	0,00	0,000
B07	SYBR	BStMV 07123PC/A	H/O	0,00	0,000
B08	SYBR	BaYDV 07005PC/A	H/O	0,00	0,000
B09	SYBR	SBWMV pc0748/A	H/O	0,00	0,000
B10	SYBR	SBCMV pc-0552/A	H/O	0,00	0,000
B11	SYBR	MCMV pc-1087/A	H/O	0,00	0,000
B12	SYBR	-K1/A	H/O	0,00	0,000
C01	SYBR	-K2/A	H/O	0,00	0,000
C02	SYBR	Отрицательный контроль	H/O	0,00	0,000
C03	SYBR	Положительный контроль	19,61	19,61	0,000

MCMV, SrMV, BMV, BYDV, BStMV, BYMV, BaMMV, WDV, WSSMV и WSMV, заражающих зерновые культуры (табл. 2). Констатировано, что тест-система для ИФА к BSMV немецкой компании «Loewe» может быть рекомендована для проведения скрининговых тестов на наличие этого вируса.

Установлена высокая специфичность наборов реагентов для ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) к BSMV фирм «АгроДиагностика» и «Синтол». Во всех проведенных экспериментах вне зависимости от варианта выделения РНК положительный сигнал наблюдался лишь для изолятов целевого объекта. Не выявлено перекрестной ложноположительной реакции с изолятами нецелевых вирусов BMV, BStMV, BaYDV, BYMV, MCMV, MDMV, SBCMV, SBWMV, WDV, WSMV и WSSMV.

Также определено, что тест-системы для ПЦР-РВ к BSMV фирм «АгроДиагностика» и «Синтол» по-

Рисунок 2. Определение аналитической чувствительности теста с праймерами BSMV-P8F/BSMV-P8R (НМОВБ ВНИИКР) в формате двухэтапной SYBR Green ОТ-ПЦР-ПВ

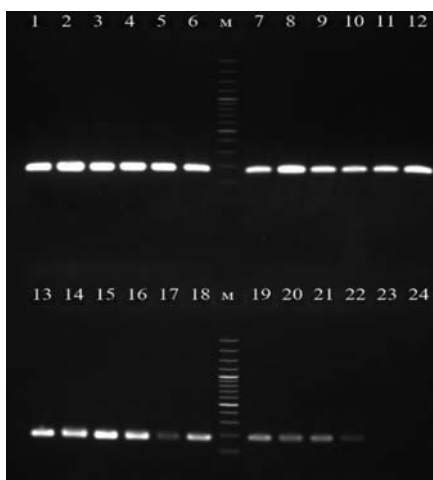
Лунка	Флуор.	Проба	C _q	Среднее C _q	Стандартное отклонение C _q
A01	FAM	BSMV PC-0330-1, без разведения (100)	20,26	20,26	0,000
A02	FAM	BSMV PC-0330-2, без разведения (100)	17,65	17,65	0,000
A03	FAM	BSMV PC-0330-3, без разведения (100)	17,15	17,15	0,000
A04	FAM	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻¹	19,59	19,59	0,000
A05	FAM	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻¹	19,64	19,64	0,000
A06	FAM	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻¹	19,82	19,82	0,000
A07	FAM	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻²	21,95	21,95	0,000
A08	FAM	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻²	22,17	22,17	0,000
A09	FAM	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻²	22,36	22,36	0,000
A10	FAM	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻³	25,08	25,08	0,000
A11	FAM	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻³	24,38	24,38	0,000
A12	FAM	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻³	25,99	25,99	0,000
B01	FAM	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻⁴	27,79	27,79	0,000
B02	FAM	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻⁴	27,45	27,45	0,000
B03	FAM	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻⁴	28,12	28,12	0,000
B04	FAM	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻⁵	29,75	29,75	0,000
B05	FAM	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻⁵	34,07	34,07	0,000
B06	FAM	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻⁵	29,87	29,87	0,000
B07	FAM	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻⁶	31,68	31,68	0,000
B08	FAM	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻⁶	33,78	33,78	0,000
B09	FAM	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻⁶	32,90	32,90	0,000
C01	FAM	Отрицательный контроль	Н/О	0,00	0,000
C02	FAM	Положительный контроль	20,18	20,18	0,000

звolyют диагностировать целевой объект при разведении инфекционного сока до 10⁻⁶ включительно со 100 % повторяемостью результатов и на достаточно низких пороговых циклах (C_q не более 32,98–34,14). Установлено, что для проведения тестов с набором реагентов для ПЦР-ПВ к BSMV компании «АгроДиагностика» в равной степени пригодна кДНК, синтезированная наборами для обратной транскрипции фирм «АгроДиагностика» и «Евроген».

Проведено испытание праймеров BSMV α -P1F/BSMV α -P1R, BSMV α -P8F/BSMV α -P8R, BSMV β -P4F/BSMV β -P4R, BSMV β -P5F/BSMV β -P5R, BSMV γ -P5F/BSMV γ -P5R и BSMV γ -P10F/BSMV γ -P10R (разработаны в НМОВБ ВНИИКР к участкам РНК α , РНК β и РНК γ BSMV) в форматах одноэтапной и двухэтапной классической ОТ-ПЦР, SYBR Green ОТ-ПЦР-ПВ и Eva Green ОТ-ПЦР-ПВ с наборами реагентов для синтеза кДНК и проведения ПЦР отечественных фирм-производителей. Для каждой пары была определена специфичность по отношению к референтным

Рисунок 3. Определение аналитической чувствительности теста с праймерами BSMV-P8F/BSMV-P8R в формате двухэтапной классической ОТ-ПЦР

Образцы:



1	BSMV PC-0330-1, без разведения (100)	13	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻⁴
2	BSMV PC-0330-2, без разведения (100)	14	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻⁴
3	BSMV PC-0330-3, без разведения (100)	15	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻⁴
4	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻¹	16	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻⁵
5	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻¹	17	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻⁵
6	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻¹	18	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻⁵
7	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻²	19	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻⁶
8	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻²	20	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻⁶
9	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻²	21	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻⁶
10	BSMV PC-0330-1, разведение 10 ⁻³	22	BSMV PC-0330-4, разведение 10 ⁻⁶
11	BSMV PC-0330-2, разведение 10 ⁻³	23	-K1 (вода)
12	BSMV PC-0330-3, разведение 10 ⁻³	24	-K2 (вода)

изолятам 13 вирусов, заражающих зерновые культуры, а также чувствительность, воспроизводимость и селективность тестов.

В экспериментах по оценке возможности использования для проведения тестов с этими праймерами 4 вариантов синтеза кДНК установлено однозначное преимущество наборов реагентов для обратной транскрипции MMLV-RT kit (Евроген) и Easy-RT (Диалат) по сравнению с наборами реагентов для обратной транскрипции фирм «Агродиагностика» и «Синтол».

Установлено, что праймеры BSMV α -P8F/BSMV α -P8R необходимо использовать в форматах двухэтапной классической ОТ-ПЦР или двухэтапной SYBR Green ОТ-ПЦР-РВ, что гарантирует 100 % специфичность тестов (рис. 1). При их применении в форматах EVA Green ОТ-ПЦР-РВ и одноэтапной SYBR Green ОТ-ПЦР-РВ возможна реакция с нецелевыми фуру-вирусами SBCMV и SBWMV. Аналогичные результаты были получены для праймеров BSMV β -P4F/BSMV β -P4R и BSMV γ -P5F/BSMV γ -P5R.

Установлено, что тесты с праймерами BSMV α -P8F/BSMV α -P8R, проведенные в форматах двухэтапной SYBR Green ОТ-ПЦР-РВ (рис. 2) и двухэтапной классической ОТ-ПЦР (рис. 3) позволяют диагностировать целевой объект при разведении инфекционного сока до 10^{-6} включительно при 100 % повторяемости результатов. Аналогичные результаты получены для праймеров BSMV β -P4F/BSMV β -P4R и BSMV γ -P5F/BSMV γ -P5R.

Определено также, что праймеры BSMV α -P1F/BSMV α -P1R, BSMV β -P5F/BSMV β -P5R и BSMV γ -P10F/BSMV γ -P10R, амплифицирующие достаточно большие участки РНК α , РНК β и РНК γ BSMV величиной соответственно 853 п.о.; 976 п.о. и 953 п.о., наиболее целесообразно использовать в формате двухэтапной классической ОТ-ПЦР с набором реагентов 5x Mas^{DP} Mix-2025 (Диалат) с предварительным синтезом кДНК наборами реагентов для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген) или Easy-RT (Диалат). Праймеры BSMV β -P5F/BSMV β -P5R можно применять также в формате одноэтапной классической ОТ-ПЦР с набором реагентов OneTube RT-PCR mix (Евроген). Соблюдение этих условий обеспечивает 100 % специфичность и высокую чувствительность (до 10^{-4} – 10^{-5} включительно) проведения тестов с этими праймерами.

Принадлежность всех получаемых продуктов амплификации к участкам генома BSMV была подтверждена их секвенированием.

Не отмечено неспецифической реакции всех изучаемых праймеров с экстрактами нуклеиновых кислот растений различных зерновых культур с сероотрицательной реакцией к BSMV, что свидетельствует о высокой селективности разрабатываемых тестов.

Выводы. В результате исследований разработана технология эффективного выявления и идентифи-

кации вируса штриховатой мозаики ячменя (BSMV). Эта технология предполагает использование скрининговых (предварительных) и подтверждающих тестов. В качестве скрининговых тестов рекомендуется использовать метод ИФА с тест-системой к BSMV фирмы «Loewe» или метод ПЦР в реальном времени с наборами реагентов для ОТ-ПЦР-РВ к BSMV фирм «Агродиагностика» или «Синтол». В качестве подтверждающих тестов предлагается использовать двухэтапную классическую ПЦР в формате «Форез» или двухэтапную SYBR Green ОТ-ПЦР в реальном времени с праймерами BSMV α -P8F/BSMV α -P8R, BSMV β -P4F/BSMV β -P4R или BSMV γ -P5F/BSMV γ -P5R. Для более детальной идентификации и изучения генетических особенностей у выявленных изолятов BSMV целесообразно использовать дополнительный тест с праймерами BSMV α -P1F/BSMV α -P1R, BSMV β -P5F/BSMV β -P5R или BSMV γ -P10F/BSMV γ -P10R, который рекомендуется проводить с применением двухэтапной классической ОТ-ПЦР в формате «Форез» с последующим секвенированием продуктов амплификации.

Список использованной литературы

1. Атабеков, И.Г. Штриховатость ячменя / И.Г. Атабеков, Г.М. Развязкина // Защита растений от вредителей и болезней. - 1961. - № 6. - С. 56.
2. Богоутдинов, Д.З. Вирусные заболевания зерновых культур в Самарской области / Д.З. Богоутдинов, Т.Б. Кастальева, Н.В. Гирсова // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2017. - № 4 (204). - С. 46-52.
3. Власов, Ю.И. Сельскохозяйственная вирусология / Ю.И. Власов, Э.И. Ларина. - М.: Колос, 1982. - 240 с.
4. Гапека, А.В. Вирус штриховатой мозаики ячменя (*Virgaviridae*, *Hordeivirus*) как этиологический агент хлоротической полосатости кукурузы / А.В. Гапека, А.А. Зеликова, С.К. Жмуркина, В.А. Леднева, Ю.Г. Волков, Н.Н. Какарека, М.Ю. Шелканов // Российская сельскохозяйственная наука. - 2018. - № 1. - С. 22-26.
5. Atabekov, J.G. Barley stripe mosaic virus / J.G. Atabekov, V.K. Novikov // CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. - 1989. - No. 344. - 6 s.
6. CABI, 2022. Barley stripe mosaic virus (stripe mosaic of barley): <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/1052912/15>.
7. Gapeka, A.V. Barley stripe mosaic virus (*Virgaviridae*, *Hordeivirus*) as biological threat for agricultural crop in the Far East / A.V. Gapeka, N.N. Kakareka, Yu.G. Volkov, M.V. Sapotskiy, M.Yu. Schelkanov // The 1st International Conference on North East Asia Biodeversity. - 2018. - P. 111.
8. McKinney, H.H. A seed-borne virus causing false-stripe symptoms in barley / H.H. McKinney // Phytopathology. - 1951. - Vol. 41. - P. 563.

9. Smith, O. A complete ancient RNA genome: identification, reconstruction and evolutionary history of archaeological Barley stripe mosaic virus / O. Smith, A. Clapham, P. Rose, Y. Liu, J. Wang, R.G. Allaby // Scientific Reports. - 2014. - 4: 4003 | DOI: 10.1038/srep04003.

Development of molecular diagnostic methods for barley stripe mosaic virus (BSMV)

T.S. Zhivaeva, Yu.N. Prikhodko, Yu.A. Shneyder, E.V. Karimova, N.A. Khorina

Summary. The characteristics and symptoms of the Barley stripe mosaic virus (BSMV) are considered. The aim of the research was to develop molecular methods for the diagnosing BSMV based on the use of polymerase chain reaction. The tasks included working out methods for extraction virus RNA from plant samples and synthesizing the first chain of

complementary DNA (cDNA) BSMV, testing and validation of real-time PCR kits from domestic manufacturers, development and testing of diagnostic primers for various parts of the virus genome. The technology of effective detection and identification of BSMV has been developed, involving the use of screening (preliminary) and confirmatory tests. It is recommended as screening tests to use the ELISA method with a test-system for BSMV from Loewe (Germany) or the real-time PCR method with reagent kits for RT-PCR-RV to BSMV from AgroDiagnostika or Syntol. As confirmatory tests, it is proposed to use 2-step classical RT-PCR in the Forez format or 2-step SYBR Green real-time RT-PCR with the developed primers BSMV α -P8F/BSMV α -P8R, BSMV β -P4F/BSMV β -P4R or BSMV γ -P5F/BSMV γ -P5R.

Key words: Barley stripe mosaic virus, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, primers.

УДК 631.8:633.854.78

<https://doi.org/10.25802/SB.2023.81.51.001>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОУДОБРЕНИЙ БОРО-Н И ФЕРТИКС МАРКА Б В ИНТЕНСИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА

В.М. Никифоров, кандидат сельскохозяйственных наук

М.И. Никифоров, кандидат сельскохозяйственных наук

И.Д. Сазонова, кандидат сельскохозяйственных наук

О.А. Зайцева, кандидат сельскохозяйственных наук

Н.М. Пасечник, аспирант

ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет»

e-mail: vovan240783@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты исследования эффективности применения внекорневых подкормок подсолнечника баковой смесью микроудобрений Боро-Н и Фертикс марка Б в условиях полевого опыта 2020–2022 гг. на серых лесных почвах Брянской области. Установлено, что однократная внекорневая подкормка в период формирования 6–10 настоящих листьев увеличивает урожайность маслосемян подсолнечника на 7 %, рентабельность их производства – на 88 %, условный чистый доход – на 3,8 тыс. руб/га, а двукратная (в период формирования 6–10 настоящих листьев и в фазу «конец бутонизации – начало цветения») – повышает урожайность на 12 %, условный чистый доход – на 4,8 тыс. руб/га. Дополнительная обработка растений подсолнечника перед цветением, несмотря на снижение рентабельности производства семян на 30 %, увеличивает урожайность культуры на 5 %, а условный чистый доход на 27 %.

Ключевые слова: подсолнечник, микроудобрение, вне-

корневая подкормка, урожайность, экономическая эффективность.

Введение. Масличный подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) как полевая культура сформировался в середине XVIII века, его значимость для сельскохозяйственной и перерабатывающей промышленности постоянно возрастает [1]. Основное количество масличного сырья и до 75 % всех выращиваемых масличных культур в РФ приходится на его долю. В России подсолнечник является основной масличной культурой, а в мире – третьей по значимости после сои и арахиса [2].

Посевные площади под подсолнечник для возделывания на маслосемена в РФ постоянно увеличиваются и в настоящее время превышают 9 млн га [3]. Это связано с его высокой маржинальностью (уровень рентабельности в отдельные годы может превышать 400 %), делающей его выгодной культурой для возделывания [4].