

# **ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТОМАТА И В ТОМ ЧИСЛЕ ВИРУС КОРИЧНЕВОЙ МОРЩИНОСТЫ ПЛОДОВ ТОМАТА (TOBRFV), МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТОМАТА**

*Турбекова Шырын, научный сотрудник лабораторий молекулярной генетики и биохимии*

## **1 Диагностика и методы диагностики вирусных заболеваний томата**

Вирусные заболевания растений представляют собой главную угрозу устойчивому сельскому хозяйству, ежегодно приводя к убыткам в несколько миллиардов долларов. Своевременная и правильная диагностика очень важна.

Диагностика болезней растений – это различные этапы и приемы определения вида возбудителя, являющегося причиной изучаемого заболевания. Диагностика основывается на свойствах патогена и на материалах наблюдений за развитием заболевания.

Для диагностики вирусов растений были разработаны и коммерциализированы многочисленные методы. Однако практическое применение каждого распространенного метода зависит от различных факторов, такие как его стоимость, чувствительность, быстрота, доступность инструментов и этап заболевания. Исходя из перечисленных факторов в основном имеются следующие методы диагностики:

Визуальный и микроскопический метод

Биологическое тестирование на растениях-индикаторах;

Серологические методы

Молекулярные – генетические методы

Методы секвенирования следующего поколения

## **2 Визуальный метод**

Диагностика болезней по внешним симптомам – прием вспомогательный, позволяющий сделать предварительное представление о природе болезни. Но данный метод очень важен для выбора комплекса диагностических методов.

По разнообразию симптомы, например, для вирусных, вириодных и фитоплазменных болезней можно условно разделить на четыре типа:

- задержка роста;
- изменение окраски различных органов;
- изменение формы и размеров органов;
- поражения некротического типа.

## **3 Методы электронно-микроскопического анализа**

Одним из наиболее классических методов визуализации вирусов в тканях растений является микроскопия. Обнаружение с помощью современных световых и электронных микроскопов высокого разрешения. Определенные вирусы, после заражения, приводят к образованию скоплений вирусных частиц наподобие включений в растительных клетках, которые можно наблюдать с помощью световых микроскопов. Каждый тип вируса предполагает собственную форму вирусных включений.

Вирусные частицы вследствие малых размеров почти прозрачны для электронов и слабо их рассеивают, для того чтобы изображение вирионов было четко видимым, используются контрастирование вирусных препаратов при их приготовлении – напыление металлом (хром, вольфрам, золото, платина и др.) или так называемое негативное контрастирование с помощью химических соединений (фосфорновольфрамовая кислота – ФВК, вольфрамат натрия, молибденово-кислый аммоний и др.).

При диагностике фитовирусов необходимо определить форму и размер вирионов, измерить не менее 100 вирусных частиц. Распределяя затем размеры вирионов по классам, определяют величину, наиболее часто встречающуюся, которую принимают за типичные

размеры исследуемого вируса. При приготовлении вирусных препаратов в качестве предметных стекол, на которые обычно помещают объект исследования, используются специальные сетки диаметром 2-3 мм (в зависимости от типа микроскопа), покрытые пленкой-подложкой из коллодия, препараты готовят методами погружения, разбавленной суспензии, приготовления препаратов лабильных вирусов.

Хотя микроскопические методы признаны полезными для обнаружения вирусов, они требуют высокого уровня навыков и опыта для определения видов вирусов. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) улучшилась морфологическая характеристика вирусных частиц как в неочищенных, так и в очищенных образцах.

Исследования с помощью ТЭМ привели к одному из первых предложений классифицировать вирусы в соответствии с их характерные группировки, основанные на их морфологических и серологических отношениях, а также как некоторые их биологические свойства. ТЕМ обеспечивает возможность прямого обнаружения, где инфицированная ткань сначала гомогенизируется с последующим негативным окрашиванием.

Различные вирусы, поражающие растения, такие как болезнь желтого курчавости листьев томатов (TYLCD), вирус S (PVS), вирус полосатой мозаики риса (RSMV), вирус **коричневой морщинистости плодов томатов (ToBRFV)**, Вирус пепино-мозаики (PerMV) наблюдали и изучали с помощью методы электронной микроскопии.

#### **4 Метод растений-индикаторов**

Индикаторным называют растение, которое дает четкую и типичную реакцию на заражение возбудителем, сравнительно легко отличимую от реакции этого же вида растения на другие патогены. Как правило, для точного определения какого-либо вируса этим методом применяется заражение двух-трех видов растений-индикаторов. Нередки и такие случаи, когда один и тот же индикатор пригоден для диагностики нескольких вирусов.

Метод растений-индикаторов пригоден при диагностике смешанных инфекций, для выделения отдельных патогенов и при определении концентрации вирусов методом биологического титрования (в этом случае используются тест-растения с локальной реакцией на вирус). В настоящее время в качестве индикаторов используется свыше 600 видов растений, относящихся к 43 семействам и 175 родам. Примеры видов растений-индикаторов и их реакции на заражение вирусами даны в охарактеризованных выше заболеваниях.

К сожалению, диагностика вирусных заболеваний по симптомам сложнее, чем для других возбудителей, из-за того, что несколько вирусов могут быть, присутствует у хозяина, что может изменить выражение симптомов

Однако на эти методы в основном влияют различные факторы окружающей среды и биологические факторы. Кроме того, визуальные осмотры бесполезны при бессимптомном течении болезни. Во многих случаях другие методы, такие как серологические, часто сочетаются с электронной микроскопией для повышения чувствительности обнаружения.

#### **5 Метод серодиагностики**

Основаны на иммуногенных и антигенных свойствах возбудителей, имеющих белок, и позволяют установить вид патогена, определить концентрацию и локализацию возбудителя в клетках и тканях растений. Серодиагностика широко применяется в фитопатологии для диагностики вирусных, фитоплазменных, бактериальных и грибных заболеваний. Получение антисывороток. Диагностические сыворотки можно получить, вводя очищенный препарат вируса в организм различных видов животных. Очищаются фитопрепараты методами дифференциального центрифугирования. В зависимости от вида

патогена варьируют и схемы введения антигена животным. После завершения цикла инъекций у животного берут кровь для получения из нее сыворотки, которую после соответствующей обработки разливается по ампулам и подвергается лиофильной сушке.

#### **Серологические методы делятся на 3 типа:**

- Капельный метод
- Энзимосвязанный иммуносорбентный тест (ELISA-тест, ИФА)
- Экспресс-метод ИФА (иммунострипы)

**Капельный метод.** Получил широкое практическое применение в XX в. В ходе исследования на стекло наносят каплю диагностической сыворотки и каплю нормальной (контрольной) антисыворотки (из крови животного, не подвергавшегося введению антигена). К каждой из них добавляют по капле сока из анализируемого растения, после чего капли смешивают и выдерживают во влажной камере при температуре 22 °С в течение 40 мин. Нормальная сыворотка служит контролем. Реакция считается положительной, если в капле с антисывороткой виден четкий осадок, отсутствующий в капле с нормальной сывороткой (рис.). Для чтения реакции используется бинокулярная лупа с увеличением в 20-25 раз.

**Энзимосвязанный иммуносорбентный тест (ELISA-тест, ИФА)** – высокочувствительный серологический метод, в основе которого лежит использование связанных с энзимами антител для определения специфических антигенов (белков возбудителей). Основные области использования ELISA в фитопатологии – детекция и количественное определение патогенов в растениях, почве или других образцах, выявление инфицированных растений до появления симптомов заболевания, а также отбор здоровых семян или посевного материала. Относительно простой и недорогой иммуноанализ быстро сделал эти методы популярными. Количество тестов ELISA, используемых для обнаружения сельскохозяйственных патогенов во всем мире, достигает 10 млн в год.

В качестве энзимов используют щелочную фосфатазу с ее субстратом п-нитрофенил фосфатом или пероксидазу. Принцип метода состоит в следующем:

- антитела, специфичные для определенного вида возбудителя, адсорбируются на специальных пластиковых пластинах с углублениями-колодцами (0,5 мм). С этой целью в колодцы добавляют раствор у-глобулиновой фракции антисыворотки;
- после инкубирования неадсорбированные антитела отмывают и затем добавляют сок больного растения. Если вирус присутствует в соке, он будет реагировать с адсорбированными антителами и, таким образом, связываться с пластинкой;
- затем в колодцы добавляют раствор, содержащий антитела, связанные с энзимом. Если вирус находится в колодце, то он связывается с энзимом. При промывании удаляется несвязанный конъюгат и в колодец добавляют энзимный субстрат.

После инкубационного периода измеряют активность энзима. Количество гидролизата прямо пропорционально количеству возбудителя. Интенсивность окраски также пропорциональна концентрации вируса.

Примечательно, что эти методы способны обнаруживать даже близкородственные штаммы одного и того же вируса. Однако для обнаружения вирусов необходимы соответствующие концентрации. Реакции меченых ферментами антител функционируют как концентрация вируса, делая метод, более применимый для количественного определения вирусной нагрузки в образцах.

#### **Экспресс-метод ИФА (иммунострипы)**

Для быстрого выявления различных болезней растений созданы тест-системы, с помощью которых в полевых условиях можно подтвердить наличие инфекции. Подобное оборудование уже с 1981 г. выпускает американская фирма Flashkits Agdia Inc. (США).

Алгоритм диагностики включает в себя выделение сока из части листа (0,15 г) исследуемого растения в емкость; погружение иммунострипа на 0,5 см до метки «sample» в сок; ожидание результата в течение 5-30 мин. По мере выполнения теста появляются одна или две полоски, указывающие соответственно на отрицательный или положительный результат.

## **6 Молекулярно-генетические методы**

В современных условиях для диагностики патогенов все более широко и успешно используются молекулярно-генетические методы. Из-за более высокой чувствительности нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) получили широкое распространение в области диагностики вирусов. Для выявления ToBRFV в семенах, а также в симптоматичных и бессимптомных растениях или плодах применяют ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием универсальных или видоспецифичных праймеров для ToBRFV

Прежде всего, это метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и его модификации: прямая, с обратной транскрипцией ОТ-ПЦР (RT-PCR), вложенная (NESTED PCR), изометрическая (LAMP PCR), FLASH ПЦР (FLASH-PCR), ПЦР в реальном времени (Realtime – RQ-PCR), матричный микрочиповый ПЦР (MICROCHIP PCR), мультипраймерная ПЦР (MULTIPLEX PCR, MULTIPRIMER PCR), цифровая ПЦР (DIGITAL PCR, dPCR), секвенирования следующего поколения (NGS). Достоинствами этих тестов являются их специфичность и высокая чувствительность, позволяющие поставить точный диагноз при минимальных концентрациях возбудителей, когда применение других общепринятых методов не эффективно.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее важных методов и считается золотым стандартом для молекулярного обнаружения различных патогенов. Обширные были внесены модификации для основанного на ПЦР анализа выявления вирусов. на основе ПЦР методы обнаруживают сигнатуры ДНК или РНК вируса с использованием молекулярных праймеров для амплификации определенной области вирусного генетического материала и являются одними из наиболее широко используемых методов для обнаружения вирусов. Методы на основе ПЦР с использованием определенных наборов, вырожденных праймеров широко используются для обнаружения вирусов в различных растениях-хозяевах. Ярким примером является томат. Обычная ПЦР обычно считается самый важный инструмент для диагностики вирусов растений; однако из-за проблем, связанных с оптимизацией условий и временем, необходимым для обнаружения, эти методы остаются менее популярными в диагностике вирусов растений. Кроме того, обычные ПЦР основана на чистой ДНК, что затрудняет ее прямое применение в вирусологии растений, так как большинство вирусы растений имеют геном на основе РНК.

### **ПЦР с обратной транскрипцией, ОТ-ПЦР (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)**

. В этом контексте использование обратной транскриптазы ПЦР (ОТ-ПЦР), работающая по принципу синтеза кДНК из РНК, является одним из наиболее перспективных подходов в диагностике вирусов растений

Как известно, у большинства растительных вирусов геном представлен одноцепочечной РНК, вирион также состоит из одноцепочечной ковалентнозамкнутой РНК, но из-за высокого процента спаренных оснований, обладает упорядоченной структурой. Однако ПЦР может быть использована и для диагностики РНК содержащих вирусов и вирионов, поскольку еще в 1970 г. Был открыт фермент – обратная транскриптаза (она же ревертаза, или РНК-зависимая ДНК-полимераза), который синтезирует ДНК на матрице РНК. Эта кДНК затем используется в качестве матрицы для ПЦР.

Метод ОТ-ПЦР является чувствительной методикой, с помощью которой может быть обнаружено малое количество молекул РНК вириона и РНК-содержащих вирусов и

фитоплазм. Со времени открытия обратной транскриптазы ОТ-ПЦР стала эталонной технологией для обнаружения и/или сравнения уровней РНК по нескольким причинам: не требует обработки после ПЦР, широкий диапазон (> 10<sup>7</sup>-кратного) содержания РНК может быть измерен, и это дает представление как о качественных, так и количественных данных.

Благодаря своей простоте, специфичности и чувствительности ОТ-ПЦР используется в широком спектре приложений – от простых экспериментов, таких как количественное определение клеток микроорганизмов в объекте, до более сложных методов диагностики для обнаружения инфекционных агентов заболеваний растений.

**ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)** – технология получила широкое распространение в исследовательских и диагностических лабораториях. Ее принципиальными особенностями являются мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Основные преимущества ПЦР в реальном времени по сравнению с методом анализа по конечной точке:

- количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- повышение специфичности реакции за счет использования гибридационных зондов;
- обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- исключение после амплификационных манипуляций с продуктом и, как следствие, снижение риска контаминации (загрязнения), экономия времени и сокращение затрат на поддержание ПЦР-лаборатории;
- автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа.

### **7 Методы секвенирования следующего поколения (омики)**

До появления технологий секвенирования следующего поколения секвенирование первого поколения (секвенирование по Сэнгеру) доминировало в области биологических исследований. Даже после появления технологий высокопроизводительного секвенирования эти методы оставались популярными для анализа благодаря более высокой производительности и относительно низкой стоимости. Технологии NGS изменили подходы как к фундаментальным, так и к прикладным исследованиям в области вирусологии растений. Благодаря способности платформ NGS генерировать огромные данные, их быстрой доставке и экономической эффективности эти методы становятся популярными в различных областях биологических исследований. Методы, основанные на NGS, используют несколько знакомых процессов, таких как извлечение общей нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) из образцов (окружающей среды, инфицированных растений-хозяев и т. д.) с последующей фрагментацией ДНК для подготовки библиотеки. Внедрив набор синтетических ДНК-адаптеров и праймеров для фрагментированной ДНК, можно использовать различные химические процессы секвенирования и платформы для анализа. Термин омика относится к различным дисциплинам в биологии, таким как метагеномика, геномика, протеомика, метаболомика и т. д., которые изучают анализ различных клеточных молекул посредством развития технологий NGS. Среди них метагеномика представляет собой изучение коллекции тотальной ДНК или РНК из смешанного сообщества организмов.

### **8 Выводы**

Мониторинг здоровья растений и быстрое обнаружение патогенов необходимы для снижения распространения болезни и способствовать эффективной практике управления.

Диагностические методы, обычно используемые для обнаружения патогенов растений, имеют ограничения, такие как требование предварительного знания последовательности генома, низкая чувствительность и ограниченная способность обнаруживать несколько возбудителей одновременно. Разработка передовых технологий секвенирования ДНК позволил определить общее содержание нуклеиновых кислот в биологических образцах. Возможность использования методов omics, в том числе платформ секвенирования третьего поколения, таких как Оксфордские нанопоры, как общий метод диагностики болезней растений, наиболее легко применимо к вирусной диагностике. Тем не менее, еще многое предстоит открыть для продвижения Современное состояние вирусной диагностики болезней растений. Несмотря на большие успехи в област инструменты диагностики патогенов, широко применимые, недорогие и простые подходы все еще отсутствующий. Более того, смешанные инфекции остаются препятствием для диагностики заболеваний. Недостатки необходимо устранить во всех методах, включая методы клеточных культур, молекулярные

Методы, иммунологические методы и другие современные методы. Правильный выбор сайт-мишень жизненно важен для успеха в молекулярном обнаружении, но обнаружение таких целей не является легкой задачей. Метагеномика недавно открыла много новых вирусных существей и, по-видимому, перспективный подход. Дальнейшее развитие инструментов биоинформатики с использованием методов NGS может способствовать потенциальным технологическим достижениям в диагностике заболеваний, которые помогут снизить потери урожая из-за возникающих болезней.

Председатель Правления  
ТОО «КазНИИ защиты карантина и растений»

Дуйсембеков Б.А.

Лектор

Турбекова Ш.М.